



Caractérisation biochimique et moléculaire du complexe SCF (SKP1-CULLIN-FBOX) chez le blé tendre

Imen Haj Salah El Beji

► To cite this version:

Imen Haj Salah El Beji. Caractérisation biochimique et moléculaire du complexe SCF (SKP1-CULLIN-FBOX) chez le blé tendre. Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2011. Français. NNT : 2011CLF22152 . tel-00999477

HAL Id: tel-00999477

<https://theses.hal.science/tel-00999477>

Submitted on 3 Jun 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ECOLE DOCTORALE
SCIENCES DE LA VIE, SANTE, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT
N° d'ordre 553

THÈSE

Presentée à l'Université Blaise Pascal
Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

(SPÉCIALITÉ : PHYSIOLOGIE ET GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE)

Soutenue le 18 Juillet 2011

Imen HAJ SALAH

CARACTERISATION BIOCHIMIQUE ET MOLECULAIRE DU COMPLEXE SCF (SKP1-CULLIN-FBOX) CHEZ LE BLE TENDRE

Président : Mr. Mohamed Fouad BOUZIDI, Professeur, Université Blaise Pascal Clermont-Fd

Rapporteurs : Mr. Soulaïman SAKR, Professeur, Université d'Angers
Mr. Grégory DECHAMP-GUILLAUME, Professeur, ENSA Toulouse
Mr. Aly RAIES, Professeur, Faculté des Sciences de Tunis

Membres : Mr. Sadok BOUZID, Professeur, Faculté des Sciences de Tunis
Mr. Said MOUZEYAR Professeur, Université Blaise Pascal (Directeur de thèse)



Université Blaise Pascal – INRA 24, avenue des Landais 63177 Aubière

Je dédie ce travail :

A mon mari, Amine,

Pour tout son soutien et pour la patience dont il a fait preuve à mon égard.

A mon fils, Mohammed,

Ma plus grande fierté !!

A mes parents,

Qui ont toujours été là pour moi, m'ont toujours fait confiance, m'ont fourni tout ce dont j'avais besoin pour que je sois dans les meilleures conditions.

A mon frère, Amine, et tout le reste de ma famille,

Que Dieu les garde et leur donne autant de bonheur qu'ils m'ont en donné.

A tous mes amis,

Qui me transmettent de la joie de vivre tout le temps et qui sont à mes côtés quand j'en ai besoin.

Remerciements

Je voudrais tout d'abord exprimer ma profonde gratitude à Monsieur Paul NICOLAS, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire au sein de l'UMR 1095 INRA /Université Blaise Pascal « Amélioration et santé des plantes » et pour ses grandes qualités humaines.

Un très grand merci à mes encadrateurs, Mr Said MOUZEYAR et Mr. M-Fouad BOUZIDI pour l'aide qu'ils m'ont donné tant sur le plan du projet en lui-même que sur le plan du soutien moral afin de pouvoir être à même de terminer ce travail.

J'adresse aussi mes remerciements à Mon professeur Sadok BOUZID, pour toute l'aide et la compréhension dont il a fait preuve à mon égard.

*Je tiens à remercier vivement les membres de mon jury, Mr Ali RAIES, Mr **Soulaiman SAKR**, **Mr** Grégory DECHAMP-GUILLAUME, d'avoir accepté de juger ce travail.*

J'ai une pensée toute particulière pour Saloua BADAoui. Je te remercie d'avoir eu la patience d'écouter mes lamentations en tout genre et surtout de m'avoir réconfortée et encouragée durant toutes ces années.

Un profond merci également à l'ensemble des membres de l'équipe GDEC, les anciens, Jane, Florence, Isabelle, Giselle, et les actuels, Monique, Delphine, Julie, Senda, Laurent, pour les bons moments passés dans le laboratoire.

Ce travail a été soutenu par une bourse accordée par le gouvernement Tunisien que je tiens à remercier à cette occasion.

Merci à tous !!!!!

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	9
INTRODUCTION GENERALE.....	11
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	14
I. LE BLE DANS LE MONDE.....	15
II. UTILISATIONS DU BLE TENDRE.....	15
III. CLASSIFICATION BOTANIQUE, ORIGINE ET CARACTERISTIQUES DU BLE TENDRE	15
IV. AMELIORATION GENETIQUE DU BLE	16
V. GENERALITE SUR LA PROTEOLYSE	17
V.1. Voie calcium dépendante	17
V.2. Voie lysosomale	18
V.3. Voie ubiquitine-protéasome dépendante	18
VI. LA VOIE DE PROTEOLYSE CIBLEE UIQUITINE/PROTEASOME 26S : ASSEMBLAGE ET FONCTIONNEMENT	19
VI.1. L'ubiquitination des protéines cibles	19
VI.1.1. L'ubiquitine.....	19
VI.1.2. La liaison des ubiquitines aux substrats	20
VI.1.2.1. Enzyme activant l'ubiquitine, E1	20
VI.1.2.2. Enzyme conjugant l'ubiquitine, E2.....	21
VI.1.2.3. Ubiquitine protéine ligase, E3	21
VI.2. Dégradation sélective des protéines polyubiquitinées par le protéasome 26S.....	22
VI.2.1. Le protéasome 26S.....	22
VI.2.2. Reconnaissance des protéines polyubiquitinées par le protéasome 26S	23
VI.2.3. Deubiquitination et dégradation des substrats.....	23
VII. LE COMPLEXE SCF	24
VII.1. Historique et Généralités sur le complexe SCF	24
VII.2. Description du complexe SCF	26
VII.2.1. La sous-unité Skp1	26
VII.2.2. La sous-unité Cullin1	27
VII.2.3. La sous-unité Rbx	28
VII.2.4. La sous-unité F-box	28
VII.3. Régulation du complexe SCF	31
VII.3.1. La protéolyse est dépendante de la phosphorylation	31
VII.3.2. Régulation par RUB1/NEDD8	31
VII.3.3. Régulation par CAND1	32
VII.3.4. Régulation par le complexe CSN	33
VIII. IMPORTANCE DU COMPLEXE SCF CHEZ LES EUCARYOTES.....	33
VIII.1. Importance chez les animaux	33
VIII.1.1. Régulation du cycle cellulaire	34
VIII.1.2. Contrôle du cancer.....	35

VIII.2. Importance chez les plantes.....	35
VIII.2.1. Régulation de la signalisation hormonale.....	35
VIII.2.1.1. Voie de l'auxine	35
VIII.2.1.2. Voie des gibbérellines	37
VIII.2.1.3. Voie de l'acide jasmonique	38
VIII.2.1.4. Voie de l'éthylène	39
VIII.2.2. Régulations du développement floral.....	40
VIII.2.3. Régulations en réponse à la lumière.....	41
VIII.2.4. Régulations du Cycle circadien.....	42
VIII.2.5. Régulations des mécanismes de défenses contre les pathogènes	42
MATERIELS ET METHODES.....	45
I. MATERIELS	46
I.1. Matériel végétal et conditions de culture	46
I.2. Souches de bactéries	46
I.3. Souches de levure	46
I.4. Plasmides	47
I.4.1. Plasmide pGEM®-T Easy	47
I.4.2. Plasmide pDONR™221.....	47
I.4.3. Plasmide d'expression	47
I.5. Acides nucléiques	48
I.6. Milieux de culture	48
I.6.1. Milieu de culture des bactéries	48
I.6.2. Milieux de culture des levures	48
II. METHODES	49
II.1. Etude bioinformatique	49
II.2. Méthodes générales de biologie moléculaire.....	49
II.2.1. Extraction des acides nucléiques	49
II.2.1.1. Extraction d'ADN.....	49
II.2.1.2. Extraction d'ARN.....	50
II.2.2. RT-PCR semi-quantitative	50
II.2.2.1. Principe de la méthode	50
II.2.2.2. Transcription inverse (RT) des ARNm en ADNc	51
II.2.2.3. Amplification des ADNc	51
II.2.3. Purification de fragments d'ADNc sur gel d'agarose	52
II.2.4. Clonage.....	52
II.2.5. Séquençage	53
II.2.6. Analyse des séquences.....	53
II.3. Traitements et prélèvements	53

II.4. Stratégies de clonage <i>in vitro</i> et expression des protéines : technologie GATEWAY	54
II.4 .1. Principe du clonage GATEWAY	54
II.4.2. Préparation des fragments d'intérêt à cloner	55
II.4.2.1. Dessin des amorces.....	55
II.4.2.2. PCR recombinante.....	55
II.4.3. Réaction de recombinaison BP	56
II.4.4. Transformation criblage et purification	56
II.4.5. Réaction de recombinaison LR.....	57
II.4.6. Transformation, criblage et purification	57
II.5. Etude de l'interaction protéine-protéine : technique du double-hybride	57
II.5.1. Principe du double-hybride	57
II.5.2. Construction des protéines de fusion « Appât » et « Proie ».....	58
II.5.3. Préparation de cellules de levures compétentes.....	58
II.5.4. Co-transformation des protéines de fusion dans la levure.....	58
II.5.5. Criblage des transformants	59
II.5.5.1. Test X-gal	59
II.5.5.2. Test CPRG.....	60
II.5.6. Analyse des résultats	60
II.6. Détection spécifique des protéines : technique du western-blot.....	61
II.6.1. Extraction de protéines totales à partir des levures	61
II.6.2. Electrophorèse dénaturante.....	61
II.6.3. Transfert sur membrane de nitrocellulose	62
II.6.4. Détection immunologique	62
II.7. RT-PCR quantitative	63
II.7.1. Principe.....	63
II.7.2. Prélèvement des échantillons.....	64
II.7.3. Conditions de PCR	64
II.7.4. Efficacité de PCR	64
II.7.5. Quantification relative des PCR en temps réel et analyses statistiques.....	65
RESULTATS	66
I. ETUDE PRELIMINAIRE DE L'EXPRESSION DE TROIS GENES SKP1, CULLIN1 ET RBX1 CHEZ LE BLE <i>TRITICUM AESTIVUM</i>	67
I.1. RT-PCR, clonage et séquençage.....	67
I.1.1. Le gène Skp1.....	67
I.1.2. Le gène Cullin1	68
I.1.3. Le gène RBX1.....	69
I.1.4. Actine.....	69

I.2. Etude de l'expression des trois gènes sous l'effet de différentes hormones.....	70
I.2.1. Profils d'expression des gènes TSK16, Cullin1 et Rbx1	70
II. IDENTIFICATION DE DIFFERENTS GENES SKP1-LIKE CHEZ LE BLE <i>T. AESTIVUM</i>	71
II.1. Etude bioinformatique	71
II.2. Nomenclature des gènes SKP1-like chez le blé <i>T. aestivum</i>	72
III. CLONAGE DES GENES TSKS, CULLIN1, F-BOX ET RBX1 CHEZ LE BLE <i>TRITICUM AESTIVUM</i> EN UTILISANT LA TECHNOLOGIE GATEWAY	72
IV. RECHERCHE DE PARTENAIRES FONCTIONNELS POUR LES DIFFERENTES PROTEINES TSKS CHEZ LE BLE.....	73
IV.1. Vérification de l'expression des différentes protéines de fusion TSKs-DBDGAL4	73
IV.2. Les protéines TSKs sont elles équivalentes ?	74
IV.2.1. La protéine TSK1	75
IV.2.2. La protéine TSK3	75
IV.2.3. La protéine TSK6.....	76
IV.2.4. La protéine TSK11	76
IV.2.5. La protéine TSK16.....	76
V. ETUDE STRUCTURE/FONCTION DE LA PROTEINE TSK11.....	77
V.1. L'interaction et/ou l'autoactivation entre TSK11 déléetée de son domaine en N-terminal et ces différents partenaires est abolie.....	78
V.2. L'interaction entre la protéine chimère N-domain-TSK6 et les protéines ZTL et ATFBLL5 est instaurée	79
V.3. TSK11 forme-il un homodimère ?	79
VI. EXPRESSION DES GENES TSKS CHEZ LE BLE	80
DISCUSSION	81
I. LA FAMILLE SKP1 CHEZ LE BLE <i>TRITICUM AESTIVUM</i>	82
II. RECHERCHE DE PARTENAIRES FONCTIONNELS	83
III. Etude structure-fonction de la protéine TSK11.....	85
IV. L'expression relative des gènes du complexe SCF chez le blé.....	87
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	89
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	93
ANNEXES	112

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES ABREVIATIONS

Produits et réactifs

β-GAL : β-galactosidase
 X-GAL : 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside
 IPTG : Isopropyl β-Dthiogalactopyranoside
 EDTA : acide ethylene diamine
 DTT : Dithiothreitol
 LB : milieu Luria-Bertani
 BET : Bromure d'éthidium
 TE : Tompon d'elution
 SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
 SDS : Sodium Dodecyl Sulfate
 Tris : Tris(hydroxymethyl)aminomethane

Acides nucléiques, clonage

ADN : acide desoxyribonucleique
 ADNc : ADN complementaire
 ARN : acide ribonucleique
 ARNm : ARN messenger
 dNTP : desoxyribonucleoside 5' triphosphate
 pb : paires de bases
 PCR : polymerase chain reaction
 qRT-PCR : quantitative reverse transcriptase-PCR
 RT : reverse transcriptase

Acides aminés

G : Gly : glycine
 A : Ala : alanine
 V : Val : valine

L : Leu : leucine
 I : Iso : isoleucine
 R : Arg : arginine
 K : Lys : lysine
 E : Glu : glutamate
 D : Asp : aspartate
 Q : Gln : glutamine
 N : Asn : asparagines
 T : Thr : threonine
 S : Ser : serine
 C : Cys : cysteine
 M : Met : methionine
 F : Phe : Phenylalaline
 Y : Tyr : tyrosine
 W : Trp : Tryptophane
 P : Pro : proline
 H : His : histidine

Unités de mesure

% : pourcent
 °C : degre Celsius
 DO : densite optique
 l : litre
 n : nano (10^{-9})
 mol : mole
 g : gramme
 % p/v : pourcent (poids par volume)
 min : minute
 s : seconde
 u : unite enzymatique
 pH : potentiel hydrogene
 h : heure
 rpm : rotation par minute
 M : mole par litre
 V : volt
 A : ampère
 Da : Dalton

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Soumis aux contraintes environnementales, les végétaux montrent une forte capacité d'adaptation, se traduisant par une grande plasticité cellulaire. Cette adaptabilité passe par des modifications de l'expression génique mais également par une altération du protéome.

Le système ubiquitine/26S protéasome (UPS) est considéré comme un élément central de la plasticité cellulaire, de par son abondance, la complexité de son organisation et sa concentration d'activités protéolytiques différentes. Cette machinerie sophistiquée, outre son rôle d'élimination des protéines mal conformées ou non fonctionnelles, contrôle une multitude de processus biologiques tels que la progression du cycle cellulaire, la régulation du métabolisme, la réparation de l'ADN, la réponse aux pathogènes mais également la transduction des signaux hormonaux. Elle est hautement spécifique grâce à un système d'ubiquitination des protéines cibles pour leur dégradation par le protéasome 26S, à l'aide d'enzymes spécifiques notées Ubiquitine ligases E3.

Les complexes SCF sont impliqués dans la voie de protéolyse ciblée. Ils représentent l'une des classes les plus fréquentes d'ubiquitine ligases E3 et ils sont composés de quatre sous-unités (Rbx, Cullin1, Skp1, et F-box). La structure et la fonction des complexes SCF, ont été étudiées chez la levure, l'homme et la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Cependant, peu de travaux ont été réalisés chez des plantes cultivées, en particulier les céréales, telles que le blé. Les SCF sont impliqués dans des voies métaboliques majeures chez tous les organismes eucaryotes. Leur rôle a été mis en évidence dans le développement et le cycle cellulaire. Chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, leur rôle a été démontré notamment dans des voies de signalisation hormonale, le développement floral et la réponse aux pathogènes.

Le laboratoire OVG (Organisation et Variabilité des Génomes Végétaux) de l'UMR Amélioration et Santé des Plantes, ASP, a longtemps travaillé sur la génétique et la physiologie moléculaires de la résistance aux maladies chez le tournesol, avec le développement d'approches de génomique structurale et fonctionnelle. Ils ont acquis une base de connaissances importantes sur ce sujet. Durant les années 2006-2007, l'INRA a souhaité restructurer ses centres de recherches et dans cet objectif, l'UMR Génétique Diversité et Ecophysiologie des Céréales, GDEC a réorienté désormais l'ensemble de ses programmes sur la génétique, la génomique structurale et fonctionnelle et l'écophysiologie du blé tendre

Triticum aestivum. Dans ce contexte, l'équipe, a initié une nouvelle thématique sur la protéolyse ciblée impliquant la voie UPS chez le blé (*Triticum aestivum*).

Le blé est d'une importance économique majeure, il représente l'une des céréales les plus cultivé dans le monde. Cependant, le séquençage et l'exploration de son génome reste complexe par rapport à d'autres céréales comme le maïs, le riz ou le sorgho. Cette complexité est due à la difficulté d'accès à un génome polyploïde, constitué en grande partie de séquences répétées et d'une très grande taille : 17 milliards de paires de bases, soit 5 fois le génome humain et 40 fois le génome du riz.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés au complexe SCF du blé (*Triticum aestivum*), et particulièrement à la protéine SKP1, composante de ce complexe multiprotéique. Chez les plantes, cette protéine intervient dans la progression du cycle cellulaire, dans les voies de signalisation hormonales, dans la régulation en réponse à la lumière, dans le développement floral et dans la différenciation des organes sexuels mâles. L'objectif de ces travaux est de caractériser les interactions entre les protéines SKP1 et ses différents partenaires. La caractérisation de ces interactions représente une étape nécessaire à la compréhension de la structure ainsi que la fonction des différentes sous-unités du complexe SCF chez le blé (*Triticum aestivum*).

Ce mémoire est composé de cinq parties, la première partie est une revue bibliographique qui apporte des éléments de compréhension sur l'organisation et la structure du complexe SCF. Elle propose quelques exemples de voies métaboliques qui impliquent ce complexe multiprotéique. La deuxième partie décrit l'ensemble du matériel biologique et des techniques utilisés lors des expériences. En particulier elle présente la méthodologie précise des différentes approches que nous avons utilisées pour l'identification des interactions protéine-protéine. La troisième partie de ce mémoire regroupe l'ensemble des résultats portant sur l'identification et la caractérisation moléculaire des gènes SKP1 suivi d'une partie discussion. La cinquième partie conclue ce travail et détaille quelques perspectives que nous avons identifiées.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LE BLE DANS LE MONDE

Le blé est l'une des principales ressources alimentaires de l'humanité. La production du blé a été estimée lors de la campagne 2008/2009 à 687 millions de tonnes (CIC 2009). L'union européenne est le premier producteur mondial (151,3 millions de tonnes) devant La chine (112,5 millions de tonnes), les Etats unies (68 millions de tonnes), la Russie (63,7 millions de tonnes) et l'Inde (78,6 millions de tonnes) (CIC 2009).

II. UTILISATIONS DU BLE TENDRE

Les principaux produits du blé sont la farine et la semoule. C'est à partir de ces deux dérivés et de leurs processus de fabrication que peuvent être obtenus tous les autres produits finaux. En effet, Ces utilisations sont multiples : panification artisanale, industrielle, pâtisserie, biscuiterie, produits nouveaux, extraction d'amidon ou de gluten, alimentation animale, utilisations non alimentaires... La diversification des utilisations et l'évolution des technologies de transformation conduisent les industriels à rechercher des meilleures qualités plus spécifiques et constantes. Néanmoins La panification reste l'utilisation spécifique majeure.

III. CLASSIFICATION BOTANIQUE, ORIGINE ET CARACTERISTIQUES DU BLE TENDRE

Le blé tendre est une monocotylédone appartenant au genre *Triticum*. C'est une plante herbacée, annuelle de la famille des Graminées. Il existe plusieurs espèces de *Triticum* qui se différencient par leur degré de ploïdie et par leur nombre de chromosome (**Tableau 1**). Parmi lesquelles on cite, le blé dur (*Triticum durum*) et le blé tendre (*Triticum aestivum*) qui sont les plus cultivées d'où leur importance économique (Feillet, 2000).

Dans le blé tendre (*Triticum aestivum*), une première étude d'hybrides F1 issus de croisements chromosomique, a montré que le blé tendre possède trois génomes AA, BB et DD constitués chacun de sept paires de chromosomes homéologues, soit au total 42 chromosomes (Kihara and Nishiyama, 1930). Le blé tendre est une espèce hexaploïde c'est-à-dire qu'il comporte 6 jeux de chromosomes ($2n = 42$, AABBDD) ; ils dérivent d'hybridations successives entre des espèces sauvages diploïdes. Le premier événement, impliquant *Triticum monococcum* ($2n = 14$, AA), et *Aegilops speltoides* ($2n = 14$, BB) a conduit à l'apparition du blé dur tétraploïde: *Triticum turgidum* ($2n = 28$, AABB). Le deuxième événement de polyploïdisation a eu lieu entre le blé dur tétraploïde et un autre blé diploïde, *Aegilops tauschii* ($2n = 14$, DD) et a donné *Triticum aestivum*, le blé tendre panifiable (Feillet, 2000).

Le blé constitue la source de protéine végétale la plus importante dans l'alimentation des hommes et plus encore des animaux. Il représente également une matière première internationale de base pour des transformations industrielles nombreuses. Cependant, l'existence chez le blé, de nombreux gènes qui interviennent dans différents caractères à fort potentiel économique (résistance aux maladies, tolérance au froid et à la sécheresse, résistance à la salinité, qualité des protéines de réserve...) nécessitent l'amélioration génétique du blé.

IV. AMELIORATION GENETIQUE DU BLE

Depuis sa domestication il y a environ 10 000 ans, les caractéristiques du blé sont en constantes modifications pour répondre aux besoins de l'Homme. D'abord, dans le cadre d'une sélection inconsciente, ensuite dans des programmes de sélection de plus en plus sophistiqués élaborés pour l'Homme, jusqu'à l'utilisation actuelles d'outils moléculaires et génomiques. Les traits agronomiques visés par cette sélection sont essentiellement la résistance aux maladies, le rendement et la qualité des réserves amylacées ou protéiques. Les niveaux en rendement atteints actuellement sont dus à l'identification et l'utilisation de certains gènes tels que des gènes de résistances à certaines maladies ou des gènes impliqués dans le développement tels que le gène de nanisme *Rht1*, qui a permis de réduire les effets néfastes de la verse et a conduit à ce que l'on appelle aujourd'hui la « révolution verte » (Doré and Varoquaux, 2006).

Cette dernière amélioration affecte un processus de développement et de l'architecture de la plante dont la régulation est probablement complexe et nécessite l'intervention de

nombreuses voies métaboliques. Parmi ces voies de régulations, nous pouvons citer les régulations transcriptionnelles via les facteurs de transcription mais aussi celle de la protéolyse ciblée ou Ubiquitine protéasome 26S (UPS).

V. GENERALITE SUR LA PROTEOLYSE

Après leur synthèse, les protéines subissent différentes modifications chimiques ainsi que des changements post-traductionnels qui conditionnent leurs activités. En plus de ces modifications et de la maturation, l'activité d'une protéine dépend de sa concentration dans la cellule (Harvey et al, 2005). La teneur en protéines de la cellule résulte d'un équilibre entre leur synthèse et leur dégradation. La durée de vie d'une protéine intracellulaire varie selon la protéine, de quelques minutes à quelques jours, ce qui constitue un point essentiel à la régulation d'un certain nombre d'événements cellulaires (Cooper, 1999).

Les protéines régulatrices telles que les facteurs de transcription sont rapidement détruites, pour permettre une modification rapide de leur concentration en réponse à des stimuli extérieurs. Les protéines anormales, résultant de défauts de synthèse ou de modifications perturbant leur fonctionnement, sont aussi dégradées rapidement du fait de leur toxicité potentielle. A l'inverse, d'autres protéines dites de ménage, sont nécessaires aux cellules sur de longues périodes, et sont beaucoup plus stables (Cooper, 1999).

La protéolyse permet aussi le recyclage en produisant à la fois les acides aminés mais aussi d'énergie. En effet les acides aminés libérés sont utilisés pour la synthèse de nouvelles protéines et représentent des substrats oxydables par les mitochondries pour la production d'énergies (Hecketsweiler, 2004).

La cellule eucaryote animale dispose de trois voies principales pour la dégradation des protéines :

V.1. Voie calcium dépendante

La calpaïne est une cystéine protéase calcium dépendante et de pH optimal neutre (Guroff and Guroff, 1964). Elle est abondante dans le cytosol et est régulée par la concentration intracellulaire en calcium. Ce système permet de dégrader les protéines de structure et de signalisation (Carafoli et al, 1998).

V.2. Voie lysosomale

Les vésicules lysosomales contiennent des protéases qui fonctionnent d'une façon optimale en milieu acide (pH 4,5 à 5,5) et dégradent les protéines de manière exergonique (Simpson, 1953 ; Hershko and Tomkins, 1971). Elles agissent sur les protéines extracellulaires introduites par endocytose et participe au renouvellement des protéines du cytosol et des organites (Cooper, 1999). Les lysosomes sont également capables de dégrader des protéines intracellulaires de manière non sélective par autophagie (**Fig. 1**) Cette fonction assure le renouvellement basal des protéines cytoplasmiques et est majoritairement responsable de la dégradation des protéines à demi-vie longue (Lloyd and Mason, 1996).

V.3. Voie ubiquitine-protéasome dépendante

La durée de vie d'une protéine est variable en fonction de la nature de la protéine et des conditions physiologiques. Cette différence de stabilité entre les protéines nécessite un système de dégradation à haut degré de sélectivité. En 1977, Etlinger et Goldberg ont découvert un système de protéolyse ATP-dépendant qui dégrade des protéines anormales au niveau des réticulocytes, qui sont dépourvues de lysosomes (Etlinger and Goldberg, 1977). A la base de cette découverte plusieurs études complémentaires ont montré que cette voie de protéolyse ATP-dépendante implique la fixation covalente, d'un ou plusieurs petit peptides, à la protéine cible (Ciechanover et al, 1980 ; Hershko et al, 1980) ; il s'agit de la voie ubiquitine-protéasome dépendante. Chez les eucaryotes, La voie ubiquitine-protéasome dépendante constitue la voie principale de dégradation protéolytique intracellulaire (**Fig. 1**). C'est une voie multi-enzymatique sophistiquée et hautement spécifique grâce au système de marquage des protéines à détruire (Hershko et Ciechanover, 1998 ; Cux et al, 1996 ; Hochstrasser, 1996). Elle prend en charge les protéines endogènes, synthétisées à l'intérieur de la cellule et intervient dans l'élimination des protéines anormales (erreurs de traduction, anomalies génétiques) ou surnuméraires, l'approvisionnement en peptides. Elle assure aussi la dégradation des protéines de régulation contrôlant des processus biologiques aussi importants que la prolifération, la différenciation, l'apoptose et la réponse aux stimuli extracellulaires (Weissman, 1997 ; Ciechanover and Schwartz, 1998 ; Voges et al, 1999 ; Glickman and Ciechanover, 2002). C'est une voie cytoplasmique et nucléaire.

VI. LA VOIE DE PROTEOLYSE CIBLEE UIQUITINE/PROTEASOME 26S : ASSEMBLAGE ET FONCTIONNEMENT

Les cellules eucaryotes possèdent une machinerie très élaborée pour dégrader les protéines par la voie de protéolyse ciblée ubiquitine/protéasome 26S. Ce système protéolytique fait intervenir deux étapes distinctes et successives ; l'ubiquitination des substrats contrôlée par une cascade enzymatique impliquant 3 types d'enzymes (Ciechanover et al, 1982 ; Hershko et al, 1983) et la dégradation sélective des protéines polyubiquitinées par le protéasome 26S (Hoffman et al, 1992). La dégradation par le protéasome 26S des protéines cibles peut se produire dans le noyau, dans le cytoplasme, ou encore à la surface du réticulum endoplasmique (Wolf et Hilt, 2004).

VI.1. L'ubiquitination des protéines cibles

Pour qu'une protéine soit reconnue et dégradée par le protéasome, un petit peptide, l'ubiquitine, doit être préalablement attaché à la protéine cible.

VI.1.1. L'ubiquitine

Découverte en 1966 (Goldstein et al, 1966), L'ubiquitine est une petite protéine monomérique de 76 résidus, et une masse moléculaire de 8,5 KDa. Sa structure est très bien conservée au cours de l'évolution chez les eucaryotes, l'ubiquitine humaine et celle d'une levure partagent 96% d'identité de séquence, cependant elle est absente chez les bactéries et les archées (Kerscher et al, 2006). Il existe deux types de modification impliquant l'ubiquitine, la mono-ubiquitination ou la multi-monoubiquitination (**Fig. 2a**) nécessaire à la régulation non-protéolytique tels que la régulation des histones, l'endocytose et le bourgeonnement des particules virales (Hicke, 2001) et la poly-ubiquitination qui est impliquée principalement dans l'adressage des protéines vers le protéasome pour leur dégradation. L'ubiquitine contient différents résidus lysine qui peuvent former entre eux des liaisons isopeptidiques (**Fig. 2b**). Les chaînes d'ubiquitine se lient, *in vivo*, par les positions 11, 29, 48 et 63. Leurs fonctions aux positions 11 et 29 sont inconnues. Par ailleurs Les chaînes à Lys48 servent de signal de dégradation par le complexe protéolytique du protéasome mais pourraient avoir d'autres fonctions. Tandis que les chaînes à Lys63 envoient

un signal aux voies non protéolytiques telles que les mécanismes de réparation de l'ADN ou l'endocytose (Weissman, 2001).

VI.1.2. La liaison des ubiquitines aux substrats

L'ubiquitination du substrat est réalisée par une série de réactions mettant en jeu trois familles d'enzymes (**Fig. 3**) : une enzyme d'activation de l'ubiquitine (E1), une enzyme de conjugaison de l'ubiquitine (E2) et une ubiquitine ligase (E3) (Hershko et al, 2000). L'Ubiquitine est activée par l'enzyme E1 en formant avec elle, par son résidu cystéine, une liaison thiol-ester. Cette réaction est couplée par une réaction d'hydrolyse d'ATP. Ensuite l'Ubiquitine est transmise, de l'enzyme E1 au site actif de la cystéine de l'enzyme E2, qui la fixe également par une liaison thiol-ester. Finalement l'enzyme E2, soit par l'intermédiaire d'E3, soit avec E3, transfère l'Ubiquitine sur le substrat via une liaison isopeptidique entre l'extrémité glycine C-terminal de l'Ubiquitine et le groupement ϵNH_2 d'une lysine spécifique du substrat (Kerscher et al, 2006). Cependant, l'ubiquitination peut se faire dans certains cas sur d'autres résidus. En effet parfois, c'est le groupement αNH_2 libre du résidu N-terminal du substrat qui représente le site d'ubiquitination (Ciechanover and Ben-Saadon, 2004). L'ubiquitine peut aussi, dans certains cas, être conjuguée à la protéine cible par une chaîne latérale de cystéine (Cadwell and Coscoy, 2005). La réaction de conjugaison de l'Ubiquitine a lieu plusieurs fois, l'Ubiquitine étant conjuguée à elle-même sur son résidu lysine, via une liaison isopeptidique, ce qui se traduit par l'addition sur le substrat d'une véritable chaîne d'Ubiquitine qui sert de signal de dégradation. L'ubiquitine contient 7 lysines, 7 types de liaisons isopeptidiques inter-ubiquitine sont susceptibles, d'être formées (**Fig. 2b**). Elle se fixe généralement sur le résidu lysine48 de l'ubiquitine précédemment liée au substrat (Finley et al, 1994).

VI.1.2.1. Enzyme activant l'ubiquitine, E1

La plupart des eucaryotes, possèdent seulement un ou deux isoformes de l'enzyme E1, se trouvant dans le cytoplasme et le noyau. Le génome d'*Arabidopsis* contient deux gènes qui codent pour deux isoformes de l'enzyme E1 (Vierstra, 2009) (**Tableau 2**), dont un est localisé dans le noyau (Hatfield et al, 1997). Chez la levure, la délétion de E1 est létale malgré l'existence de protéines «E1-like» (Bachmair, 2001 ; Hass and Siepmann, 1997).

VI.1.2.2. Enzyme conjugant l'ubiquitine, E2

Chez les eucaryotes, les enzymes E2 forment une superfamille de protéines apparentées. Chez *Arabidopsis*, il existe 45 protéines E2 (**Tableau 2**) (Vierstra, 2009) et «E2-like». Elles sont au nombre, de treize chez la levure, *Saccharomyces cerevisiae*, et d'une trentaine chez les mammifères (Weissman, 2001 ; Bachmair, 2001). La fonction physiologique de cette famille d'enzyme n'est pas complètement définie, néanmoins, différentes protéines E2s possèdent un domaine catalytique central, de 150 acides aminés, renfermant un résidu cystéine critique pour la formation d'une liaison thiol-ester avec l'ubiquitine, et des extensions N et/ou C-terminale variables (Scheffner, 1998 ; Hamilton et al, 2001).

VI.1.2.3. Ubiquitine protéine ligase, E3

L'ubiquitine protéine ligase, E3 joue un rôle principal dans la reconnaissance des protéines cibles. Si l'on considère la multitude des protéines cibles sujettes à ubiquitination, il n'est pas étonnant d'observer une grande hétérogénéité de structure des protéines E3. Chez *Arabidopsis* il existe plus de 1400 protéines E3 (**Tableau 2**) (Vierstra, 2003, 2009). Elles appartiennent à deux classes différentes : les E3 à domaine RING (Really Interesting New Gene) et les E3 à domaine HECT (Homologous to the E6AP Carboxyl Terminus).

Les RING E3s se lient à la fois au complexe E2-Ubiquitine et à la protéine cible, ce qui rapproche la lysine nucléophile du substrat au groupement réactif thiolester et facilite le transfert d'ubiquitine (Ozkan et al, 2005). Ils peuvent être soit monomérique (E3 à domaine HECT, les RING/U-BOX) et reconnaissant l'acide aminé en position N-terminale de la protéine cible (**Fig. 4a et b**) (Varshavsky, 1996) soit formés de plusieurs sous-unités. Cette dernière classe est représentée par plusieurs complexes tels que le complexe APC (Anaphase Promoting Complex), responsable de l'ubiquitination de protéines régulatrices du cycle cellulaire, les enzymes E3s de type SCF (Skp1-Cdc53-F-box), les E3s de type CUL3-BTB/POZ (CULLIN 3-Bric a brac, Tramtrack and Broad complex/Pox virus and Zinc finger), les enzymes E3s de type CUL4-DDB1 (UV-Damaged DNA-Binding Protein 1) (**Fig. 4c, d, e et f**) (Pickart, 2001). La particularité de ces complexes est de renfermer des protéines adaptatrices, spécifiquement responsables de la reconnaissance des substrats (Tyers and Willems, 1999). Le Domaine RING-finger est défini par 8 résidus cystéine et/ou histidine coordonnant 2 atomes de zinc. Il a été montré sur des protéines humaines à motif Ring, que ce

domaine est essentiel à l'activité de l'enzyme E3 ubiquitine ligase (Lorick et al, 1999). Dans le cas d'HECT E3, l'Ubiquitine est tout d'abord transférée, via une liaison thiolester, d'E2 à un résidu cystéine se trouvant dans un domaine conservé d'environ 350 acides aminés au niveau de la région C-terminale de l'enzyme E3 puis l'ubiquitine se transporte au substrat. La portion N-terminale des protéines HECT E3 serait impliquée dans la reconnaissance des substrats (Ardley and Robinson, 2005). Le génome humain code pour au moins 20 enzymes de ce type, qui interagissent avec 2 classes d'enzymes E2s (Schwarz, 1998). Les E3 assurent l'essentiel de la spécificité de la réaction grâce à leur grande diversité (**Tableau 2**), bien qu'il existe une certaine redondance dans le système. Ainsi, une même protéine peut être reconnue par différentes E3 et une même E3 peut reconnaître différents substrats. Récemment on a découvert une enzyme E4 qui intervient dans l'assemblage de la chaîne d'ubiquitines (Koegl et al, 1999).

VI.2. Dégradation sélective des protéines polyubiquitinées par le protéasome 26S

VI.2.1. Le protéasome 26S

Le protéasome 26S est un complexe protéolytique composé de plus de 40 sous-unités, de masse molaire d'environ 2,4 MDa. Cette protéase est formée par l'association de 2 sous-complexes (**Fig. 5a**) : un cœur catalytique, la particule 20S ou Core Particle (CP) renfermant les activités protéolytiques, et un complexe régulateur, le 19S ou Regulatory Particle (RP), responsable de la reconnaissance des substrats marqués d'une chaîne de polyubiquitine, de leur dépliement, de leur translocation dans le 20S, ainsi que de leur déubiquitylation (Pickart and Cohen, 2004 ; Cux et al, 1996 ; Voges et al, 1999). Le sous-complexe 20S est un complexe de 700 kDa en forme de cylindre creux il est majoritairement présent dans le cytoplasme et le noyau, mais est également associé au réticulum endoplasmique, où il dégrade les protéines anormales immédiatement après leur synthèse.

Chez la levure et les mammifères, il est constitué de 14 sous-unités différentes assemblées en quatre anneaux (α 1-7, β 1-7, β 1-7, α 1-7) dont trois (β 1, β 2 et β 5) (**Fig. 5b**), ils définissent une cavité interne qui renferme un site actif responsable des activités protéolytiques et peptidasiques (Demartino and Gillette, 2007). Le protéasome 20S est une protéase auto-compartmentée, car l'assemblage des sous-unités α en anneau forme un pore central de très faible diamètre (**Fig. 5c**). Les anneaux α constituent une barrière physique

limitant l'accès des substrats à la chambre protéolytique délimitée par les anneaux β . Cette architecture complexe prévient tout d'abord l'hydrolyse incontrôlée des protéines intracellulaires. Le sous-complexe 19S est un complexe de 1 MDa constitué de 20 sous-unités qui peuvent s'associer à l'une ou aux deux extrémités du cylindre 20S appelés le « couvercle » et la « base » (Demartino and Gillette, 2007). La « base » du complexe 19S contient différentes ATPase qui fournissent l'énergie nécessaire à l'assemblage du protéasome 20S et des complexes 19S en un protéasome 26S, à l'hydrolyse des substrats, à l'ouverture des pores du protéasome 20S délimités par les sous-unités α et à l'introduction des substrats à l'intérieur de la chambre catalytique du protéasome 20S (Braun, 1999). Le « couvercle » est uniquement formé de sous-unités non ATPasiques. Il est indispensable à la reconnaissance spécifique des chaînes de polyubiquitine et contient également une activité isopeptidasique permettant d'hydrolyser ces chaînes en ubiquitine libre (Glickman, 1998).

VI.2.2. Reconnaissance des protéines polyubiquitinées par le protéasome 26S

La reconnaissance d'un substrat spécifique est l'objectif final de la cascade d'ubiquitination. Le substrat doit être marqué par une chaîne de quatre ubiquitines au minimum, pour être reconnu puis détruit par le complexe protéolytique du protéasome (Baumeister et al, 1998). La plupart des protéines ubiquitinées sont adressées au protéasome grâce à des protéines navettes se liant d'un côté à des chaînes d'ubiquitine et, de l'autre, au complexe régulateur 19S (Farras et al, 2005).

VI.2.3. Déubiquitination et dégradation des substrats

La cascade d'ubiquitination est réversible par l'intervention d'enzymes de déubiquitination (DUBs) qui peuvent dépolymériser les chaînes d'ubiquitine (Wilkinson et al, 2005). Cette étape constitue un point de régulation supplémentaire du processus de dégradation ubiquitine-dépendant du protéasome 26S.

En effet, une fois reconnu par le protéasome 26S, le substrat ubiquitiné est déplié et transloqué dans la chambre protéolytique 20S. De façon simultanée, le substrat est déubiquitiné. Le clivage de la chaîne d'ubiquitine est nécessaire au recyclage de l'ubiquitine pour permettre leurs réutilisations afin de marquer d'autres protéines dans la cellule et donc assurer un taux de protéolyse normal. Cependant, bien que la déubiquitination du substrat soit

indispensable à sa dégradation, elle ne peut se faire que couplée à celle-ci, sinon elle risque de dissocier le substrat (Pickart and Cohen, 2004). La protéine clé de ce processus est une sous-unité du couvercle du sous-complexe 19S appelée, Rpn11. Chez la levure, Une mutation de cette protéine entraîne l'accumulation de protéines polyubiquitinées et une mort cellulaire. Rpn11 coupe la liaison entre le substrat et la première ubiquitine et libère des chaînes de polyubiquitine (Yao and Cohen, 2002).

Chez les eucaryotes, il a été montré que le complexe 19S présente une activité de type chaperonne. Cette activité est portée par la base du complexe 19S incluant 6 protéines, notées Rpt1 à Rpt6. Chacune de ces 6 sous-unités est essentielle à la dégradation des protéines et pourrait avoir un rôle différent en fonction du substrat à dégrader (Rubin et al, 1998). La dégradation des protéines se fait par un mécanisme processif. La protéine serait ainsi entièrement dégradée jusqu'à ce que les peptides produits soient suffisamment petits pour diffuser hors du protéasome de manière passive (Akopian et al, 1997).

VII. LE COMPLEXE SCF

Nous avons vu précédemment que la spécificité de l'étape d'ubiquitination est cruciale pour le processus de dégradation des protéines et que cette étape nécessite l'intervention des enzymes ubiquitine ligases E3. C'est pour cela que ces enzymes ont fait l'objet d'études massives. Parmi ces enzymes ubiquitine ligases E3, le complexe SCF.

VII.1. Historique et Généralités sur le complexe SCF

Des études génétiques et biochimiques, faites sur la levure *Saccharomyces cerevisiae*, ont montré que des protéines cdc53, cdc4 et deux autres protéines skp1 et Rbx1, forme un complexe ubiquitine ligase E3 qui intervient, avec l'enzyme E2, cdc34, dans la régulation de la transition de la phase G1-S du cycle cellulaire (Patton et al, 1998 ; Tyers and Jorgensen, 2000). La sous-unité Skp1 a été tout d'abord identifiée en association avec la protéine skp2 dans un complexe avec la cycline A-cdk2 humaine. Ensuite, elle a été indépendamment isolée au moyen d'interactions génétique et physique avec la protéine Cdc4 de la levure et la cycline F humaine. L'alignement des séquences protéiques de la cycline F, Cdc4 et Skp2 a révélé l'existence d'un motif conservé d'environ 40 acides aminés appelé domaine F-box relatif à la cycline F et qui correspond au site de fixation de SKP1 (Bai, 1996). Les interactions

génétiques et physiques entre Cdc34, Cdc 53 et Cdc4 ont suggéré que ces composants forment un complexe E2-E3 (Mathias et al, 1996). Par ailleurs des études sur le nématode *C.elegans*, ont montré que le composant cdc53 orthologue de la CUL1 joue un rôle conservé dans la dégradation des protéines et le contrôle du cycle cellulaire (Kipreos, 1996). Par la suite, des études ultérieures ont montré qu'il existe des interactions directes entre Skp1, Cdc34 et Cdc53 et différentes protéines F-box et forment un complexe spécifique à activité ubiquitine ligase, nommé le complexe SCF (Patton et al, 1998 ; Skowyra *et al*, 1997). Il doit son nom au trois sous-unités SKP1, Cullin (CUL/CDC53) et E-box qui le constituent. La protéine Rbx (appelé aussi Roc1 ou Hrt1) est la dernière sous-unité identifiée du complexe SCF. Elle a été purifiée en association avec la protéine VHL (Tumour suppressor protein) liée à la protéine Cul2 (Kamura et al, 1999). Chez l'Homme, la sous-unité Rbx a été isolée, composante du complexe SCF et est associée à Cdc53.

Le complexe SCF est donc constitué de quatre sous-unités protéiques (**Fig. 6a**) : Rbx1, Cullin1, Skp1 et F-box. Il est caractérisé par une structure et une organisation conservées de la levure jusqu'à l'Homme. La structure cristallographique (**Fig. 6b**) du complexe SCF humain a été définie (Jackson and Eldridge, 2002 ; Zheng *et al*, 2002). Sa structure générale est très allongée. La protéine Cullin1 occupe une position centrale, c'est elle qui organise la structure du SCF, en fixant le complexe Skp1-F-box par son extrémité N-terminale, et Rbx1 par son extrémité C-terminale. Cullin1 et Rbx1 constituent la sous-unité catalytique du complexe et forme un site d'ancrage à l'enzyme E2.

Skp1 a un rôle d'adaptateur entre l'ensemble Cullin1-Rbx1 et la sous-unité F-box, qui est la sous-unité conférant la spécificité du complexe SCF. En effet, La protéine F-box reconnaît, d'un côté, les substrats grâce à des motifs d'interaction protéine-protéine comme les motifs WD40 ou LRR (Leucine-Rich Repeats) et de l'autre, le complexe Skp1-Cull1-Rbx1, grâce au domaine F-box qui lie Skp1. Rbx1, qui est une petite protéine à motif RING, semble intervenir à la fois dans l'ancrage des composants du système et dans la stimulation de l'activité E2 (Smalle and Vierstra, 2004).

Chez *A. thaliana*, 21 protéines Skp, 5 Cullin, 3 Rbx et 703 F-box différentes ont été identifiées à ce jour. L'existence d'un très grand nombre de gènes codant pour des F-box semble indiquer qu'il existe potentiellement autant de protéines cibles à dégrader. Ainsi, le complexe SCF représente l'une des classes les plus fréquentes d'ubiquitine E3 ligase à domaine RING.

VII.2. Description du complexe SCF

VII.2.1. La sous-unité Skp1

Skp1 (S-phase kinase-associated protein) est une protéine relativement petite approximativement, 163 acides aminés, à forme dimérique, qui peut être dénaturé à basse température. La protéine Skp1 est composée essentiellement de deux domaines principaux : l'extrémité N-terminal qui fixe la protéine Cullin1 et l'extrémité C-terminal qui fixe les protéines F-box (Zheng et al, 2002). La structure en 3D du complexe SCF^{Skp2} (**Fig. 7**) a montré que la protéine Skp1 humaine fixe la protéine F-box, Skp2, par l'intermédiaire de quatre hélices α nommée H5, H6, H7 et H8. Le domaine N-terminal de la protéine Skp1 contient approximativement, 125 résidus, et a une structure semblable au domaine BTP/POZ, caractérisé par des structures α/β avec en particulier la présence d'une hélice α , H4. Quand à l'extrémité C-terminale, elle est représentée par deux hélices α , H7 et H8. Le domaine POZ/SKP1 se termine par deux hélices α , H5 et H6. Ainsi le domaine F-box se trouve entouré, d'un côté par les trois hélices H5, H6, H7 et de l'autre côté par l'hélice H8 et l'extrémité C-terminale de la protéine Skp2. Juste après le domaine F-box, on trouve approximativement 70 résidus (linker) caractérisé par la présence de trois LRRs, suivis de sept LRRs. Ces dix résidus, sont caractérisés par une structure courbée en hélice α/β (Schulman et al, 2000).

Chez les mammifères, des études de délétions, ont montré que la totalité de la protéine Skp1 est nécessaire à la fixation de la protéine Skp2. Cependant, il est intéressant de noter que les mutations au niveau de l'extrémité N-terminale affectent plus l'interaction avec la protéine Skp2, que celle au niveau de l'extrémité C-terminale (Raymond et al, 1998). La protéine Skp1 joue un rôle primordial dans la progression du cycle cellulaire, la régulation de la transcription et de nombreux processus physiologiques à l'échelle cellulaire chez les eucaryotes (Hellmann and Estelle, 2000 ; Raymond et al, 1998). En particulier, la mutation du gène Skp1 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* altère la progression du cycle cellulaire au niveau des transitions G1/S et G2/M (Bai et al, 1996 ; Connelly and Hieter, 1996). Chez *Caenorhabditis elegans*, les protéines SKRs, (SKP1 Related genes) sont essentielles à la morphogenèse, l'embryogenèse, le développement larvaire et la prolifération cellulaire (Nayak et al, 2002 ; Yamanaka et al, 2002). Chez les plantes, plusieurs études ont été faites sur la famille des protéines SKP1-like et ont montré son rôle dans des voies de signalisation hormonales ; à

savoir les voies de réponses à l'auxine, à l'acide gibbéréllique, à l'éthylène, et à l'acide jasmonique ; en réponse à la lumière, dans développement floral et dans la différenciation des organes sexuels mâles. En particulier chez *Arabidopsis thaliana*, on a identifié 21 protéines SKP1-like (Farras et al, 2001 ; Gagne et al, 2002 ; Risseuw et al, 2003). ASK1 est la première protéine SKP1-like caractérisée chez *Arabidopsis* (Porat et al, 1998). Il a été démontré qu'ASK1 interagit avec la protéine CUL1 et elle est capable de former différents complexes SCF (Gray et al, 1999 ; Gagne et al, 2002). L'analyse phylogénétique (**Fig. 8**) des protéines ASKs, a permis de les classer en huit groupes basés sur leur pourcentage de similarité de séquences. En particulier et en comparaison avec les protéines Skp1 de la levure et l'Homme, les protéines ASK1 et ASK2 sont les plus conservées au cours de l'évolution. Ils représentent le groupe 1 et se caractérisent par 84.8% d'homologie de séquence (Gagne et al, 2002). Des analyses d'expression par RT-PCR des différents gènes ASKs ont montré une expression des gènes ASK1 et ASK2 dans tous les tissus de la plante (Takahashi et al, 2004). Tandis que les autres gènes sont exprimés préférentiellement dans certains tissus. De plus, le gène ASK1 se caractérise par un niveau d'expression relativement élevé (Zhao et al, 2003). D'autres études ont montré qu'une mutation du gène ASK1, engendre une stérilité mâle ainsi qu'une formation anormale des fleurs (Yang et al, 1999 ; Zhao et al, 2003). Cependant, le rôle physiologique des autres ASKs n'a pas été décortiqué. En effet, Les phénotypes mutants *ask11*, *12*, *14* et *18* ne manifestent aucune différence par comparaison au phénotype sauvage (Takahashi et al, 2004). Chez *Oryza sativa*, 32 gènes SKP1 ont été recensés et nommés, OSKs (*Oryza sativa* SKP1-like). Cependant peu de travaux ont été faits, pour caractériser les protéines OSKs (OsSkp1 - OsSkp15) et certaines protéines ASKs ont permis de caractériser l'orthologue de ASK1 chez le riz, OsSkp15. Les analyses par la technique double hybride ont montré qu'OsSkp15 forme avec la protéine OsCul1 et GID2 (protéine F-box) un complexe SCF^{GID2} (Gomi et al, 2004).

VII.2.2. La sous-unité Cullin1

La protéine Cull1 (cdc53 chez la levure), approximativement 776 acides aminés, permet l'ancrage des différents éléments du complexe SCF. Par sa partie N-terminale, la Cull1 interagit avec la protéine de liaison Skp1 et par sa partie C-terminal la protéine Rbx. Elle forme ainsi le domaine catalytique du complexe SCF qui recrute l'enzyme activatrice E2 (Pintard et al, 2004). La famille des protéines Cullin est représentée par six gènes chez la levure et l'homme. Chez *Arabidopsis thaliana*, 11 gènes Cullin ont été recensés par homologie

de séquences (Mudgil et al, 2004 ; Mazzucotelli et al, 2006). Cependant, seulement six protéines contiennent le site de fixation de la protéine RUB qui régule l'activité de la sous-unité Cullin (Del Pozo and estelle, 1999 ; Querido et al, 2001 ; Del Pozo et al, 2002). Ces protéines ont été classées en trois groupes : le premier groupe est représenté par la famille des CUL1 et contient AtCUL1, AtCUL2 et AtCUL5. Il a été montré que les protéines CUL1 et CUL2, sont capables de former des complexes SCF (Risseuw et al, 2003) et que la protéine CUL1 interagit avec ASK1 pour former le complexe SCF^{TIR} (Gray et al, 1999). De plus, La mutation du gène *AtCUL1* (CUL1) cause un arrêt précoce de l'embryogenèse (Shen et al, 2002). Le deuxième groupe comprend la famille des CUL3 avec CUL3A et CUL3B, ces deux protéines se caractérisent par 88% d'identité de séquence et sont les orthologues potentiels de la protéine CUL3 chez *Caenorhabditis elegans* et chez l'Homme (Pintard et al, 2003). Finalement, le dernier et troisième groupe est représenté uniquement par AtCUL4. Elle est distincte des autres protéines Cullin d'*Arabidopsis thaliana* et ressemble étroitement à la protéine CUL-4a (Shen et al, 2002) chez l'Homme.

VII.2.3. La sous-unité Rbx

La protéine Rbx (aussi appelée Roc1 ou Hrt1) est la plus petite protéine du complexe SCF, approximativement 108 acides aminés. Elle est représentée par le domaine Ring qui est défini par une série de 8 cystéines et histidines qui transportent les ions zincs. Il existe deux types de motif Ring : le motif Ring HC qui porte 7 cystéines et une histidine en position 4 et le motif Ring H2 qui porte 6 cystéines et 2 histidines en position respective 4 et 5 (Borden, 2000).

Chez *Arabidopsis thaliana*, il existe deux protéines Rbx, nommées AtRbx1 et AtRbx2. Lechner et ses collaborateurs ont montré qu'AtRbx1 interagit avec deux protéines cullin, AtCUL1 et AtCUL4 et deux protéines ASK1 et ASK2. Des analyses de northern-blot ont montré que la protéine AtRbx1 est exprimée dans tous des organes de la plante particulièrement dans la fleur et les graines en germination et aurait un rôle dans la division cellulaire (Lechner et al, 2004).

VII.2.4. La sous-unité F-box

La protéine F-box, d'environ 430 à plus de 1000 acides aminés, contient un domaine conservé de 60 acides aminés dans la région N-terminale, qui sert de site d'ancrage entre la

protéine F-box et la protéine Skp1. Le domaine F-box est composé de deux sous-domaines ; 40 acides aminés qui représentent le cœur du site de fixation à la protéine Skp1 et les 20 acides aminés restant représente un domaine variable qui fixe préférentiellement telle ou telle protéine Skp1. La partie C-terminale contient un domaine variable impliqué dans la reconnaissance du substrat et confère la spécificité au complexe SCF. Ces domaines d'interaction protéine-protéine, fixent la protéine cible pour l'ubiquitination et constituent donc des éléments régulateurs clés de la stabilité des protéines ciblées pour la dégradation par le protéasome 26S (Gagne et al, 2002).

Les protéines F-box sont codées par une grande famille de gènes dans différents organismes : 11 chez la levure, 22 chez la drosophile, 68 chez l'Homme, 326 chez *Caenorhaditis elegans*, 687 chez *oryza sativa* et 694 gènes potentiels Chez *Arabidopsis thaliana* (Jain et al, 2007 ; Kipreos and Pagano, 2000 ; Jin et al, 2004 ; Gagne et al, 2002). Chez les mammifères, les protéines F-box ont été groupées en trois groupes : FBW contenant un domaine répété WD40 ; FBL contenant un domaine LRR (Leucine-rich repeat) et FBX contenant des domaines inconnus (Winston et al, 1999). De la même manière, chez *Arabidopsis* les protéines F-box, contenant plusieurs domaines conservés (connus ou encore inconnus), en aval du domaine F-box, ont été classés en 19 groupes (**Fig. 9**) (Kuroda et al, 2002). En plus du domaine WD40 et LRR, d'autres domaines connus ont été identifié chez *Arabidopsis* tel que le domaine Kelch (Xue and Cooley 1993), le domaine ARM (Armadillo repeats) (Peifer and Wieschaus, 1990), le domaine PAS/PAC (Ponting and Aravind, 1997), le domaine Actin-like (Sheterline et al, 1995) et le domaine Ring fingers (Freemont et al, 1991). Les protéines F-box sont classées en 19 groupes, contenant plusieurs domaines connus conservés, en aval du domaine F-box, impliqués dans l'interaction protéine-protéine. Parmi lesquels on a les domaines WD40, LRR, Kelch, ARM, PAS/PAC, Actin like et Ring fingers. D'autres domaines sont encore inconnus tels que les domaines CRFA, CRFB et CRFC. Tous ces domaines connus sont impliqués dans des interactions protéine-protéine, il est donc probable qu'ils représentent dans la sous-unité F-box, des sites d'interaction avec les protéines cibles. Chez *Arabidopsis*, les protéines F-box à domaine Kelch représentent le groupe le plus majoritaire suivi du groupe représenté par le domaine LRRs (Kuroda et al, 2002). Il a été montré aussi que certaines protéines F-box contiennent des domaines de fixation à l'ADN tels que le domaine zf-MYND (Lutterbach et al, 1998), le domaine HSF (heat shock factor) (Clos et al, 1990 ; Sorger, 1991), le domaine Myb (Aasland et al, 1996) et le domaine HLH (helix-loop-helix) (Littlewood and Evan, 1995). Ces domaines sont probablement impliqués directement ou indirectement dans la régulation de la transcription (Kuroda et al, 2002).

D'autres protéines F-box se caractérisent par la présence de domaines fonctionnels tel que le domaine PPR (pentatricopeptide repeat) (Small and Peeters, 2000), le domaine RVT reverse-transcriptase-like (Xiong and Eickbush, 1990), le domaine Tub (Noben-Trauth et al, 1996) et le domaine SEL1 (Grant and Greenwald, 1996). Au total 120 protéines F-box contiennent des domaines fonctionnels connus et conservés. Trois nouveaux domaines conservés ont été également identifiés et nommés CRFA, CRFB, CRFC (Conserved Region of F-box protein A, B et C) (**Fig. 9**) (Kuroda et al, 2002).

Protéines F-box à domaine CRFA :

Les protéines F-box contiennent un nouveau domaine nommé CRFA représenté par 130 acides aminés et caractérisé par un résidu leucine conservé. Probablement ce groupe de protéine F-box appartient à un sous-groupe de la famille des F-box à motif LRR et donc ce nouveau domaine serait nécessaire à la fixation de la protéine cible. Chez *Arabidopsis thaliana* 123 protéines F-box contiennent le CRFA, il existe également chez *Lotus japonicum*, *Medicago truncatula*, *Hordeum vulgare*, et *Solanum tuberosum* ce qui témoigne probablement de leur importance chez les plantes.

Protéines F-box à domaine CRFB :

107 protéines F-box contiennent le domaine CRFB, composé de 80 acides aminés et situé en aval du domaine F-box d'un intervalle de 30 à 50 acides aminés. La prédiction de la structure secondaire suppose que le domaine CRFB soit composé de 6 feuillets β . Cette structure se trouve également au niveau des domaines Kelch et WD40 et elle est responsable de la fixation du substrat, donc le domaine CRFB est probablement impliqué dans la fixation de la protéine cible.

Protéines F-box à domaine CRFC :

67 protéines F-box contiennent le domaine CRFC composé de 100 acides aminés et situé en aval du domaine F-box d'un intervalle de 90 à 100 acides aminés. L'alignement des séquences d'acides aminés révèle la présence de quatre régions conservées. La prédiction de

la structure secondaire suppose la présence de quatre feuillets β et la structure tertiaire deux structures : β sandwich et épingle à cheveux responsables des interactions protéines-protéines.

La diversité structurale des protéines F-box suggère un nombre important de protéines cibles à dégrader (Kipreos and Pagano, 2000). Plusieurs études ont montré que les protéines F-box sont impliquées dans un large éventail de fonctions biologiques récapitulées dans le **Tableau 3** (Jain et al, 2007).

VII.3. Régulation du complexe SCF

L'analyse de l'association du complexe SCF a mis en évidence la présence d'autres facteurs qui interviennent dans son activité tels que la phosphorylation et la neddylation/deneddylation.

VII.3.1. La protéolyse est dépendante de la phosphorylation

La grande variété des protéines cibles du protéasome nécessite une régulation et un contrôle temporel de la dégradation. La plus connue est certainement la cascade de phosphorylation/déphosphorylation du substrat. Des études ont permis de montrer que l'ubiquitination des protéines de levure Sic1, inhibiteur de la phase S, dépend de la phosphorylation de ces protéines. Les protéines Skp1, cdc53 (cullin), et cdc4 (F-box) forment avec l'enzyme E1 et E2/Cdc34, un complexe d'ubiquitination SCF^{cdc4}. La protéine F-box, cdc 4, contient le domaine WD40 qui reconnaît uniquement et spécifiquement les protéines Sic1, phosphorylée par Cln/Cdc28. Lors de la progression du cycle cellulaire, particulièrement la transition G1/S, le complexe SCF^{cdc4} catalyse l'ubiquitination et la dégradation de Sic 1 ce qui permet l'entrée en phase S (Winston et al, 1999 ; Renny et al, 1997). Une autre protéine F-box, Grr1 contenant un domaine LRR qui reconnaît la forme phosphorylée de la cycline G1, Cln2 (Yuchu et al, 2001).

VII.3.2. Régulation par RUB1/NEDD8

Chez les plantes et la levure, Rub1 (homologue de la protéine Nedd8, Neural precursor cell expressed developmentally downregulated 8, chez d'autres espèces) est une protéine de 8 kDa qui ressemble fortement à l'ubiquitine et a la propriété de se fixer sur d'autres protéines

mais incapable de former une chaîne protéique et d'adresser des substrats vers une voie de dégradation (Hochstrasser, 2000). La protéine Rub1 (Related to ubiquitin1) améliore l'activité des complexes SCF en formant une liaison covalente avec un résidu lysine situé dans la région C-terminale de toute les cullin (**Fig. 10**), à l'exception de la cullin 4B et APC2 (Pan, 2004). La neddylation est catalysée par 2 enzymes nommées APPBP1-hUba3 chez l'Homme et Ula1-Uba3 chez la levure. La fixation de Rub1 n'est pas nécessaire à l'assemblage et au fonctionnement des SCF, mais en facilitant la fixation d'E2, elle augmente l'efficacité de l'ubiquitination et la dégradation (Furukawa et al, 2000 ; Podust et al, 2000).

Le génome d'*Arabidopsis* code pour trois protéines RUB-like. Deux d'entre elles, RUB1 et RUB2, sont impliquées dans la régulation de la voie de réponse à l'auxine, la production d'éthylène et la croissance végétative (Bostick et al, 2004). D'autres études ont montré qu'une modification dans la voie de neddylation entraîne une perte de viabilité chez la levure, un développement anormal chez le nématode, une résistance à l'auxine chez la levure et un arrêt de l'embryogenèse chez les mammifères (Lammer et al, 1998 ; Tateishi et al, 2001).

VII.3.3. Régulation par CAND1

Il existe une autre molécule impliquée dans la voie de modification par RUB1/NEDD8 et associée aux complexes SCF. Au début, elle a été nommée Tip120A pour son association avec la protéine de liaison TATA (TBP) dans les complexes de transcription, ensuite renommée CAND1 (Cullin-Associated Neddylation Dissociated1) (**Fig. 10**).

CAND1 forme une liaison avec la protéine cullin non neddylée et exclue de ce fait la fixation de Skp1 et la formation du complexe SCF. A l'inverse donc de la neddylation, qui bloque l'interaction de CAND1 et stabilise par la suite l'activité du complexe Skp1-Cul1-Rbx1. En d'autre terme, CAND1 dissocie le complexe Cullin1-Skp1 ; tandis que Rub1/Nedd8 dissocie le complexe Cullin1-CAND1, d'où l'existence en équilibre des complexes actifs et inactifs (Liu et al, 2002). Des études génétiques faites sur *Arabidopsis*, ont montré que la protéine CAND1 s'associe préférentiellement, comme chez les mammifères, à la cullin non neddylée. De plus, ils ont montré le rôle de la protéine CAND1 dans la régulation positive de l'activité des complexes SCF^{UFO}, SCF^{TIR1}, SCF^{COI1} et SCF^{SLY1} (Chuang et al, 2004 ; Feng et al, 2004). Une mutation au niveau de CAND1, entraîne une diminution de la croissance du méristème caulinaire apical et axillaire ainsi qu'une baisse de fertilité. Elle réduit, l'activité des complexes SCF^{COI1} et SCF^{TIR1} en réponse à l'acide jasmonique et à l'auxine ainsi qu'une

perte de la dominance apicale. Enfin elle perturbe la voie de réponse à l'acide gibbérellique en entraînant une accumulation importante de la protéine RGA (Répresseur de la voie de l'Acide Gibbérellique (Feng et al, 2004). D'autres études sur les mammifères ont montré que plusieurs sous-unités du protéasome s'associent à Tip120A/Cand1, d'où son rôle dans le recyclage du complexe SCF inactif (Makino et al, 1999).

VII.3.4. Régulation par le complexe CSN

Une autre entité appelée Cop9/signalosome ou CSN, tout d'abord identifiée comme répresseur de la photomorphogenèse chez les plantes, est capable de catalyser le clivage de la protéine RUB1/Nedd8 des Cullin. CSN est un complexe multiprotéique (composé de 8 protéines), qui a été impliqué dans différents processus comme la photomorphogenèse, la progression du cycle cellulaire, la protéolyse, la phosphorylation, la transduction des signaux, la régulation de la transcription et le transport nucléocytoplasmique (Wei et al, 2003).

Chez *Arabidopsis*, le CSN est nécessaire dans la voie de réponse à l'auxine et les étapes du développement floral, impliquant les complexes SCF^{TIR1} et SCF^{UFO} (Schwechheimer et al, 2002 ; Wang et al, 2003). Des mutants CSN accumulent des Cullins hyperneddylés, cependant cet effet n'est pas accompagné par une augmentation de l'activité du complexe SCF mais plutôt d'une diminution de son activité qui dépend *in vivo* des cycles de neddylation/deneddylation (Lyapina et al, 2001).

Deux fonctions du complexe CSN ont été caractérisées. La première consiste en l'assemblage et le maintien du complexe Cullin1/Skp1/F-box (Wolf et al, 2003) et la deuxième en son association au complexe SCF en tant que sous-unité alternative d'un protéasome, pour accélérer la dégradation du substrat ubiquitiné (Peng et al, 2003).

VIII. IMPORTANCE DU COMPLEXE SCF CHEZ LES EUCARYOTES

VIII.1. Importance chez les animaux

Chez les animaux, Les complexes SCF sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques tels que le contrôle du cycle cellulaire, l'apoptose ou encore le contrôle de certains cancers.

VIII.1.1. Régulation du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est l'ensemble des événements responsables de la duplication de la cellule. Il permet donc le maintien d'une information génétique constante en quantité et qualité au niveau des chromosomes. Il est essentiellement constitué de l'interphase au cours de laquelle les chromosomes sont répliqués et de la mitose au cours de laquelle les chromosomes se répartissent entre les deux cellules filles. Pour les organismes eucaryotes vivants, il est indispensable que les différentes phases du cycle cellulaire soient précisément coordonnées. Les phases doivent suivre un ordre correct et une phase doit être terminée avant que la phase suivante ne démarre. Chez l'Homme, les différents passages du cycle cellulaire sont contrôlés par une famille de gènes appelée CDK, dont la concentration ne varie pas. L'activité des CDK est régulée par des cyclines, qui sont des protéines formées et dégradées au cours du cycle cellulaire. Les cyclines se fixent sur les molécules de CDK, les phosphorylent et permettent ainsi la régulation de leur activité. La progression des différentes phases nécessite la participation d'une cycline particulière qui favorise l'expression des cyclines de la phase suivante et répriment l'expression ou favorisent la dégradation des cyclines de la phase précédente. La dégradation des cyclines, par la voie de protéolyse ubiquitine dépendante, est indispensable à l'inactivation de la CDK associée (Meijer et al, 2003 ; Pines, 1995). Deux types d'ubiquitine ligase E3 interviennent dans le cycle cellulaire, le complexe SCF, activé par la *F-box protein* Skp2 (Nakayama et al, 2001) et le complexe APC-cyclosome (Peters et al, 2002). L'APC est actif de la fin de la phase G2 jusqu'au milieu de la phase G1. Le complexe SCF est actif du milieu de la phase G1 jusqu'au début de la phase G2 et les principaux substrats qu'il dégrade assurent la progression du cycle.

Les protéines Skp1, Cullin1 et la F-box Skp2 forment un complexe qui fixe l'ensemble des cyclines A-CDK2 dans les cellules de mammifères. Le taux d'ARNm de la F-box Skp2 est particulièrement élevé durant la phase S et des micro-injections d'anticorps anti-Skp2 dans des cellules humaines inhibent l'entrée en phase S. Skp2 serait donc un régulateur important de la phase S. Les protéines Skp1 fixent indirectement les complexes cyclines A-Cdk2, par l'intermédiaire de Skp2 ; et fixent Skp2 par l'intermédiaire du motif F-box de Skp2 (Zhang et al, 1995).

Chez la levure, la délétion de *skp1* conduit à un double phénotype : un arrêt en début de mitose sans formation de fuseau mitotique et un arrêt de la cytokinèse avec formation de septum. Parmi les seize protéines F-box identifiées dans la levure ; La délétion de *Pof6*, une

de ces protéines F-box, conduit également à un phénotype de cytocinèse. Des données de purification de complexe montrent que Pof6 interagit *in vivo* avec Skp1 mais ne recrute pas la Cullin, ce qui indique que Skp1-Pof6 forme un complexe autre que le complexe Skp1-Cdc53/Cullin-F-box. Ces données suggèrent une nouvelle fonction du complexe Skp1-Pof6 durant le cycle cellulaire (Hermand et al, 2003).

VIII.1.2. Contrôle du cancer

Les complexes SCF régulent la dégradation de nombreuses protéines impliquées dans le contrôle de la division et la croissance cellulaire. La protéine F-box Fbw7/hCdc4 a été identifiée tout d'abord par sa capacité à fixer la cycline E. Par la suite, il a été montré que le complexe SCF^{Fbw7} peut également cibler les oncoprotéines cMyc, cJun et Notch pour leur dégradation. La F-box Fbw7 régule négativement ces oncoprotéines clés.

La F-box Fbw7 est un suppresseur de tumeur qui est muté dans de nombreux cancers chez l'Homme. Il existe trois isoformes de Fbw7, localisées dans des compartiments subcellulaires distincts. Les mécanismes de suppression de tumeurs par Fbw7 sont complexes, et ne sont pas encore bien compris (Minella et Clurman, 2005). L'isoforme Fbw7 γ est nucléaire et régule l'accumulation de cMyc. cMyc est un activateur de croissance cellulaire. L'inactivation de Fbw7 provoque une augmentation de la taille des cellules. L'activation de cMyc, due à l'inactivation de Fbw7 dans les cancers, aurait un rôle primordial (Welcker et al, 2004).

VIII.2. Importance chez les plantes

Chez les plantes, La protéolyse ubiquitine-dépendante est un système déterminant, impliqué dans différentes voies de signalisation hormonales, le développement florale, la formation des racines latérales, le contrôle du cycle circadien ou encore les mécanismes de défense contre les pathogènes.

VIII.2.1. Régulation de la signalisation hormonale

VIII.2.1.1.Voie de l'auxine

L'auxine est une phytohormone, qui contrôle la division et l'élongation cellulaire tout au long des processus de développement de la plante tel que l'élongation des tiges, la formation des racines latérales, la dominance apicale, le phototropisme et le gravitropisme (Millner, 1995). Ces réponses à l'échelle de la plante entière se traduisent à l'échelle cellulaire par des changements rapides de l'expression de certains gènes. La réponse à l'auxine est régulée par deux classes de famille protéiques les Aux/IAA qui sont codées par les gènes AXR1 (AUXIN Resistant) et les facteurs de transcription ARFs (Auxin Response Factors). Chez *Arabidopsis*, une mutation du gène AXR1, entraîne des plantes naines incapables de produire leurs racines latérales (Lincoln et al, 1990). La structure d'AXR1 est similaire à la moitié N-terminal de l'enzyme E1, elle se lie à une protéine ECR1 qui présente en revanche une similarité avec la région C-terminal de l'enzyme. D'où la formation d'un hétérodimère qui est équivalent à l'enzyme E1 et qui active la protéine Rub1/Nedd8 (Pozo et al, 1998).

Les protéines ARF sont des activateurs d'expression des gènes de réponse à l'auxine sur lesquels ils sont fixés de manière permanente. Les AUX/IAA sont des régulateurs négatifs, ils se fixent sur les protéines ARF et bloquent la transcription des gènes de réponse à l'auxine en formant des dimères (Dharmasiri and Estelle, 2004). Le génome d'*Arabidopsis* code pour 22 protéines ARFs et 29 protéines Aux/IAA (Vierstra, 2009). La famille des gènes Aux/IAA a été aussi trouvée chez *Medicago truncatula*, la Tomate, le Tabac, le Cotton, le maïs, le riz et le pin mais pas dans le génome des champignons et des animaux probablement parce qu'elle est spécifique aux plantes (Reed, 2001). Il a été mis en évidence que les protéines Aux/IAA sont localisées dans le noyau (Abel et al, 1994) et présentent quatre domaines conservés nommés I, II, III et IV. Le domaine I est le plus petit et le moins conservé des trois domaines, il ne possède pas d'activité biochimique spécifique mais responsable de la répression de la transcription. Le domaine II est hautement conservé, une mutation de ce domaine déstabilise l'activité des protéines Aux/IAA. Finalement, les domaines III et IV régule l'homo et l'hétéro-dimérisation des protéines Aux/IAA ainsi que leur hétéro-dimérisation avec les protéines ARFs. Quant aux protéines ARFs, elles se caractérisent par un domaine C-terminal homologue aux domaines III et IV et un domaine N-terminal hautement conservé qui correspond au site de liaison à l'ADN (Reed, 2001).

L'intervention essentielle de la protéolyse ubiquitine dépendante dans la voie de réponse à l'auxine, a été constatée à travers l'élimination ciblée, par le protéasome 26S, des répresseurs transcriptionnels, les Aux/IAA (Leyser, 2002). Chez *Arabidopsis*, La protéine F-box TIR1 (Transport Inhibitor Response 1) représente un récepteur à l'auxine (Kepinski and

Leyser, 2005 ; Dharmasiri et al, 2005). En effet en se fixant à l'hormone, TIR1 reconnaît, grâce à son motif LRR, les protéines Aux/IAA, au niveau de leur domaine II et provoque par l'intermédiaire du complexe SCF^{Tir1} leur dégradation (**Fig. 11a**). Les Aux/IAA déstabilisées ne peuvent plus se dimériser avec les ARF qui deviennent alors capables d'activer la transcription des gènes de réponse à l'auxine. Lorsque la quantité d'auxine diminue les Aux/IAA sont stables et peuvent se dimériser avec les ARF, empêchant les gènes de réponse à l'auxine d'être transcrits (Parry and Estelle, 2006 ; Huq, 2006). Chez *Arabidopsis*, Une mutation du gène TIR1 entraîne une déficience dans l'élongation de l'hypocotyle et dans la formation des racines latérales (Craig and Tyers, 1999).

VIII.2.1.2. Voie des gibbérellines

Les gibbérellines sont des phytohormones qui contrôlent le développement des plantes. En effet ils représentent une large famille de régulateurs diterpéniques tétracycliques de croissance des plantes et sont associés à différents processus de développement tels que la germination des graines, l'élongation des tiges et des hypocotyles, la floraison, le développement des fruits, l'expansion des feuilles (Olszewski et al, 2002). La voie de signalisation des gibbérellines présente des similitudes avec celle de l'auxine sauf que dans ce cas, l'activité des E3 ligases n'est pas contrôlée directement par l'hormone mais indirectement par la présence d'un récepteur intermédiaire de l'acide gibbérellique permettant l'interaction entre une F-box et un régulateur négatif à dégrader. Ces récepteurs sont probablement situés au niveau de la membrane plasmique (Gilroy and Jones, 1994 ; Hooley, 1994). Tout comme l'auxine, les gibbérellines provoquent des changements rapides de l'expression de gènes et impliquent des régulateurs positifs et des régulateurs négatifs. Par exemple chez le riz, GID1, et la protéine F-box GID2 sont des régulateurs positifs. Au contraire, les protéines DELLA, dont SLR1 chez le riz, sont des régulateurs négatifs. La voie de réponse à l'acide gibbérellique est donc bloquée par cette famille de protéines qui se caractérise par la présence d'un domaine DELLA, N-Terminal, indispensable à la voie de dégradation par le protéasome 26S dépendante de l'acide gibbérellique. Une mutation au niveau de ce domaine entraîne chez *Arabidopsis thaliana*, des plantes devenues insensibles à l'acide gibbérellique (Willige et al, 2007). Il a été montré que GID1 est un récepteur des gibbérellines, qui interagit physiquement avec SLR1. Cette interaction a lieu en présence de gibbérellines. Les gibbérellines induisent également la phosphorylation de SLR1, qui interagit alors directement avec GID2. Cette interaction permet l'étiquetage de SLR1 par le complexe SCF^{GID2} et sa dégradation par le

protéasome 26S (**Fig. 11b**) (Huq, 2006 ; Ueguchi-Tanaka et al, 2007). Comme OsGID2, le gène AtSLY1, est un régulateur positif de la voie de signalisation de l'acide gibbérellique chez *Arabidopsis*. Des essais de clonage de ces gènes, ont révélé qu'ils codent pour des protéines homologues contenant un domaine F-box, situé dans la partie N-terminal (McGinnis et al, 2003 ; Sasaki et al, 2003). Une mutation au niveau de ces gènes entraîne également des plantes insensibles à l'acide gibbérellique (Sasaki et al, 2003 ; Steber et al, 1998). En particulier une mutation au niveau du gène SLEEPY1 (SLY1), entraîne une accumulation importante des protéines DELLA même après un traitement à l'acide gibbérellique (Jacobsen et al, 1993).

Ainsi de manière comparable, les auxines et les gibbérellines stimulent l'interaction entre leurs récepteurs et des régulateurs négatifs, pour provoquer la dégradation rapide de ces régulateurs négatifs par le protéasome 26S, et induire l'activation de gènes spécifiques.

VIII.2.1.3. Voie de l'acide jasmonique

L'acide jasmonique est une classe d'hormone végétale qui module l'expression de différents gènes et régule le développement de divers processus tels que la régulation de l'appareil reproducteur et la défense contre les insectes et les pathogènes (Browse and Howe, 2008 ; Browse, 2005). Des études sur *Arabidopsis thaliana* ont montré qu'un gène COI1, CORONATINE INSENSITIVE 1, est essentiel à la voie de l'acide jasmonique. Le gène COI1 code pour une protéine riche en motif LRR qui correspond à la protéine F-box COI1 et composante d'un complexe SCF^{COI1} (Linghui et al, 2002). Chez *Arabidopsis*, des mutant *coi-1* deviennent insensibles à l'acide jasmonique et incapables d'activer la transcription des gènes de réponse à l'acide jasmonique. Ces mutants sont mâle stériles sensibles à des attaques d'insectes (Xie et al, 1998). Les substrats du complexe SCF^{COI1} sont représentés par une famille de protéines répresseurs caractérisés par la présence d'un domaine, JAZ (JA-ZIM).

Par analogie à la voie de réponses à l'auxine, en présence de l'acide jasmonique, COI1 reconnaît grâce à son motif LRR les protéines JAZ et provoque par l'intermédiaire du complexe SCF^{COI1} leurs dégradations. Une fois dégradés, les régulateurs négatifs JAZ, ne peuvent plus se fixer aux facteurs de transcription, MYB2 (MYB DOMAIN PROTEIN 2) qui deviennent capable d'activer les gènes de la voie de l'acide jasmonique (**Fig. 12**) (Thines et al, 2007 ; Chini et al, 2007).

VIII.2.1.4. Voie de l'éthylène

L'éthylène module de nombreuses voies métaboliques notamment en réponse aux stress biotiques et abiotiques. Cette phytohormone, contrôle des étapes importantes de la vie de la plante comme la germination, la maturation des fruits et la floraison. Elle est également impliquée dans la sénescence des organes et la défense contre les pathogènes et certains traumatismes (Johnson and Ecker, 1998 ; Wang and Ecker, 2002). L'éthylène est synthétisé à partir de la Méthionine qui donne de la S-Adénosylméthionine transformé par une enzyme ACC synthase, ACSs, génère l'acide amino-cyclopropane carboxylique ou ACC, une molécule précurseur de l'éthylène. Une autre macromolécule, l'ACC oxydase, ACO, transforme l'ACC en donnant de l'éthylène. L'étape limitante de la synthèse d'éthylène est constituée par la conversion de la Met en ACC par l'ACC synthase (Kende, 1993). La synthèse de l'éthylène est régulée par un rétro contrôle-positif par l'éthylène sur les gènes de sa voie de biosynthèse en particulier l'enzyme ACC synthase qui est codée par trois types de gènes. La stabilité des enzymes ACC synthase de type 1 et 2 dépend de leurs séquences régulatrices C-Terminales, reconnues par des enzymes E3 ligases (Joo et al, 2008 ; Yoshida et al, 2006). Suite à un traitement à l'éthylène, les enzymes ACC synthase de type 1 sont phosphorylées au niveau de leur domaine C-terminal ce qui empêche la reconnaissance par une enzyme E3 ligase encore inconnue ainsi que leurs dégradations (Joo et al, 2008). Concernant, l'enzyme ACC synthase de type 2, la présence d'éthylène bloque également, par phosphorylation, la reconnaissance de l'enzyme par une E3 ligase de type CUL3-BTB/POZ, dont la protéine CUL3 se lie aux protéines BTB ; ETO1 (ETHYLENE-OVERPRODUCING 1), EOL1 (ETO1-LIKE) et EOL2 ; et fixe l'enzyme ACC synthase en vue de sa dégradation (Chae et al, 2003 ; Christians et al, 2009). Chez *Arabidopsis* une mutation du gène EOL1 entraîne une augmentation du niveau des enzymes ACC synthase, ACS 5, et une surexpression d'éthylène (Wang et al, 2004). L'hormone est ensuite perçue par une famille de cinq récepteurs (ETR1, ETR2, ERS1, ERS2 et EIN4) (Chen et al, 2007). La liaison de l'hormone engendre l'inactivation de la fonction des récepteurs ce qui constitue une régulation négative (Hua and Meyerowitz, 1998). Une protéine EIN2, qui constitue un régulateur positif du signal éthylène, devient capable de stimuler la transcription des activateurs de transcription EIN3 et EIL1 (EIN3-like) qui vont stimuler à leur tour la transcription des gènes de réponse à l'éthylène en se liant aux promoteurs d'autres facteurs de transcription comme les ERFs. En absence d'éthylène, les récepteurs se retrouvent dans un stade fonctionnellement actif. Ils activent constitutivement une protéine CTR1 qui est un régulateur négatif qui bloque le signal

éthylène en aval (**Fig. 13**) (Kieber et al, 1993). La quantité disponible d'EIN3 est réduite par l'action de deux complexes SCF qui implique chez *Arabidopsis* l'action des protéines F-box, EBF1 et d'EBF2 (Binder et al, 2007 ; Potuschak et al, 2003).

Ainsi L'intervention de la protéolyse ubiquitine dépendante dans la voie de réponse à l'éthylène se manifeste à différents niveaux en impliquant des enzymes E3s de type SCF et non SCF.

VIII.2.2. Régulations du développement floral

Chez *Arabidopsis thaliana* les fleurs sont composées de quatre organes concentriques contenant quatre sépales, quatre pétales, six étamines et deux carpelles, qui sont issus du méristème de la fleur (Smyth et al, 1990). Différents gènes ont été identifiés impliqués dans le contrôle du développement de la fleur ; en particulier le modèle ABC a été proposé. Ce modèle est basé sur trois classes de facteur de transcription A, B et C qui sont exprimés dans les zones de chevauchement du méristème de la fleur. L'expression des gènes A, résulte en la formation des sépales, l'expression combinée des gènes A et B d'une part, et B et C d'autre part, mène respectivement à la formation des pétales et des étamines. Finalement l'expression des gènes C, engendre la formation des carpelles (Ma and dePamphilis, 2000).

Il a été montré que différentes sous-unités protéiques constituant les complexes SCF sont impliquées dans le développement floral. En effet, chez *Arabidopsis thaliana*, un des gènes responsables pour l'expression des gènes B s'appelle UNUSUAL FLORAL ORGANS ou UFO. Le gène UFO code pour une protéine F-box qui fait partie d'une ubiquitine E3 ligase et qui cible un répresseur possible des gènes de classe B, pour la décomposition par le protéasome (Zhao et al, 2001b).

Des mutations dans le gène UFO codant pour la protéine F-box provoquent de multiples anomalies du développement floral (Ni et al, 2004). Par ailleurs, un allèle mutant nul de AtCul1 provoque un arrêt du développement de l'embryon au stade une seule cellule (Shen et al, 2002). Des fonctions réduites d'AtCul1 provoquent de sévères anomalies du développement floral, en lien avec la voie de l'auxine. AtCUL1 serait donc un composant de multiples SCF jouant des rôles cruciaux dans le développement floral. De plus, des plantes avec un niveau d'expression d'At-Rbx1 réduit par ARN interférence (RNAi), présentent des défauts de morphologie florale. Des plantes mutantes homozygotes pour *ask1* (*Arabidopsis* Skp1-like 1) ou hétérozygotes pour *ask2*, présentent d'autres anomalies, dont l'inhibition du

développement des pétales. Un mutant *ask1-1* est mâle stérile et est défectueux dans son développement végétatif et reproductif. ASK1 et ASK2 sont très proches par leur séquence et leur profil d'expression (Yang et al, 1999 ; Zhao et al, 1999). Ces protéines interagissent avec différentes F-box, dont UFO, dans des essais doubles hybrides de levures. Les deux gènes ont probablement des fonctions redondantes dans le développement floral. UFO interagit également avec AtCUL1 dans des essais de co-immunoprécipitation. L'existence d'interactions génétiques entre UFO et AtCUL1 conforte l'hypothèse du rôle d'un complexe SCF^{UFO} régulant de multiples aspects du développement floral (Ni et al, 2004).

VIII.2.3. Régulations en réponse à la lumière

Etant donné l'importance de la lumière dans la vie de la plante, il n'est pas surprenant que certains composants de la voie de protéolyse ubiquitine dépendante soient impliqués dans la photomorphogénèse. Deux types de photorécepteurs sont présents chez *Arabidopsis* : les phytochromes (récepteurs à la lumière rouge) et les cryptochromes (récepteurs à la lumière bleue). Les phytochromes sont représentés par une petite famille multigénique désignée par cinq phytochromes PHYA-E qui codent pour des protéines de 125 kDa (Mathews and Sharrock, 1997). Le phytochrome est capable de percevoir la lumière rouge et d'engendrer une réponse caractéristique en fonction de la longueur d'onde reçue. Il est présent sous deux formes selon la lumière : Pr (forme inactive) pour la lumière rouge et Pfr (forme active) pour la lumière rouge lointaine. Ces deux formes sont photoconvertibles (Huq, 2006). La régulation de la voie de protéolyse ubiquitine dépendante en réponse à la lumière est divisée en deux parties ; la première est caractérisée par la dégradation des régulateurs positifs de la photomorphogénèse à l'obscurité et la seconde est caractérisée par la dégradation des régulateurs positifs à la lumière (Hoecker, 2005).

En effet, chez *Arabidopsis* la suppression de la photomorphogénèse durant la germination des graines à l'obscurité, nécessite l'intervention d'une RING E3 ligase COP1 CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC qui ubiquitine des régulateurs positifs de la photomorphogénèse tel que HY5, LAF1 et HFR1 pour leur dégradation par le protéasome 26S (Hoecker, 2005 ; Osterlund, 1999, 2000). Par opposition des régulateurs négatifs de la photomorphogénèse appelés PIF1 et PIF3 sont stable à l'obscurité et dégradé suite à un signal lumineux (Shen et al, 2005). La protéine COP1 est aussi capable de contrôler la quantité des photorécepteurs à la lumière. En effet, il a été montré que COP1 intervient dans la dégradation du phytochrome A par la protéolyse ubiquitine-dépendante. Donc, la protéine COP1, en

association avec le protéasome 26S, fonctionne comme un modulateur crucial, contrôlant le niveau des photorécepteurs ainsi que les facteurs de transcription nécessaires à la photomorphogénèse (Seo et al, 2003 ; Clough and Vierstra, 1997).

VIII.2.4. Régulations du Cycle circadien

Le rythme circadien est une bonne illustration de la façon dont les êtres vivants notamment les végétaux ont su prendre en compte une régularité extérieure d'origine planétaire, et synchroniser sur lui l'ensemble des fonctions des organismes. Chez *Arabidopsis thaliana* plusieurs gènes impliqués dans la régulation du cycle circadien ont été identifiés tel que des facteurs de transcription CCA1 (CIRCADIAN CLOCK–ASSOCIATED1) et LHY (LONG ELONGATED HYPOCOTYL) ainsi que des régulateurs TOC1 (TIMING OF CAB EXPRESSION1). Ces derniers appartiennent à une famille de protéines nommée PRR (Pseudo-Response Regulator) dont les gènes s'expriment à différents moments de la journée. Particulièrement les gènes TOC, s'accumulent au moment du crépuscule et activent l'expression des gènes CCA1 / LHY dont les produits vont se lier au promoteur des gènes TOC1 pour réprimer leur transcription (Green and Tobin, 1999 ; Alabadí et al, 2001, 2002 ; Mizoguchi et al, 2002). En plus des protéines TOC, le cycle circadien est contrôlé par des protéines F-box : ZEITLUPE (ZTL) (Somers et al, 2000 ; Jarillo et al, 2001), FKF1 (FLAVIN BINDING KELCH F-BOX 1) (Schultz et al, 2001) et LKP2 (LOV KELCH PROTEIN 2) (Nelson et al, 2000), qui possèdent, en plus de leur domaine F-box, un motif LOV (Light Oxygen Voltage) ainsi que six motifs Kelch respectivement au niveau de leurs extrémités N et C-terminales (Somers et al, 2000 ; Jarillo et al, 2001). La présence du domaine F-box dans les protéines ZTL, suggère qu'elles appartiennent à un complexe SCF. En effet Más et al. (2003b) ont montré que la protéine ZTL, régule le niveau du gène TOC1 à l'obscurité en provoquant sa dégradation par le protéasome 26S.

VIII.2.5. Régulations des mécanismes de défenses contre les pathogènes

Les plantes dans leur environnement naturel peuvent entrer en contact avec de nombreux agents pathogènes (bactéries, virus, champignons...) qui peuvent être inoffensifs ou conduire dans certains cas à une infection plus ou moins destructrice. Le système immunitaire de la plante peut être divisé en deux cas (Jones and Dangl, 2006). Dans le premier cas, la détection des pathogènes exige un grand jeu de récepteurs transmembranaires,

PRPs, conçus pour reconnaître des composants génériques des pathogènes (PAMPs). La perception de ces motifs par la plante pourra déclencher une réponse immunitaire de base (PAMP-Triggered Immunity, PTI), qui élicite une mort cellulaire autour du site d'infection, afin de limiter la diffusion du pathogène (Schwessinger and Zipfel, 2008). Cependant, si les défenses mises en place sont inappropriées le pathogène va proliférer et les plantes vont développer des protéines codées par les gènes de résistance R. La réponse en découlant est décrite comme l'immunité déclenchée par les effecteurs (Effector-Triggered Immunity, ETI) ou résistance gènes pour gènes (Jones and Dangl, 2006). L'immunité ETI est souvent décrite comme menant à une mort cellulaire programmée localisée au niveau des tissus infectés : la réponse hypersensible (HR) (Jones et al, 2006). Ces réponses, impliquent un certain nombre de composants de la voie ubiquitine/protéasome 26S (Craig et al, 2009). Il a été montré qu'un phytovirus, le polerovirus, code pour une protéine P0 un suppresseur fort du PTGS (Post-Transcriptional Gene Silencing), responsable de la voie de défense du RNA silencing. Ce phénomène d'extinction de gènes est un moyen de défense antiviral chez les plantes. Un motif F-box a été identifié dans la partie N-terminale de la protéine P0 qui lui permet de s'intégrer dans un complexe E3-ubiquitine ligase, responsable de l'ubiquitination de protéines cibles destinées à la dégradation par le protéasome 26S. En effet la protéine P0 est capable d'interagir avec la protéine ARGONAUTE 1 (AGO1) qui est un constituant essentiel de la voie du RNA silencing, pour induire sa dégradation, et engendrer de ce fait un ensemble de perturbations au niveau de la voie des miRNA. Une mutation dans le motif F-box entraîne la perte d'interaction avec les protéines ASK ainsi que la perte d'activité de suppression de silencing de la protéine P0. Cette mutation confère une baisse importante de la pathogénicité du virus. Ainsi des plantes de *Nicotiana benthamiana*, dans lesquelles l'expression du gène SKP1 a été diminuée par la technique du Gene Silencing, se sont avérées résistantes à l'infection par les polerovirus. Dans ce modèle, la P0 interagirait avec la protéine SKP1 pour constituer un complexe SCF^{P0} conduisant une protéine AGO1 vers l'ubiquitination et la dégradation par le protéasome 26S (Pazhouhandeh et al, 2006).

Comme les virus, les bactéries, ont également trouvé des façons pour reconstituer des complexes SCF. Pendant l'infection, *Agrobacterium tumefaciens* transfère une protéine de type F-box notée VirF dans les cellules hôtes et utilise des composants hôtes pour former un complexe SCF fonctionnel conduisant des protéines VirE2 et VIP1 vers l'ubiquitination et la dégradation par le protéasome 26S (Schrammeijer et al, 2001). VirE2 et des protéines VIP1 sont éliminées pour permettre l'intégration de l'ADN-T d'*Agrobacterium* dans le génome hôte

(Tzfira et al, 2004). VirF est la première protéine procaryote identifiée contenant un domaine F-box conservé (Schrammeijer et al, 2001).

Les complexes SCF sont donc impliqués dans de multiples aspects du développement des plantes, directement ou indirectement, notamment par leur rôle de premier plan dans les voies de signalisation hormonales.

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS ET METHODES

I. MATERIELS

I.1. Matériel végétal et conditions de culture

Dans cette étude nous nous sommes intéressés à la variété de blé tendre « Récital ». Les semences de blé ont été mises à notre disposition par l'Institut National de la Recherche Agronomique de Clermont-Ferrand (INRA). Elles sont mises en germination sur un terreau standard individuellement dans des pots en plastiques et placées dans une chambre de culture jusqu'au stade végétatif « 3 feuilles » dans les conditions contrôlées suivantes : température de $18 \pm 1^\circ\text{C}$, 16h d'éclairage et 8h d'obscurité, une intensité lumineuse d'environ $200 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{sec}$ et 45% d'humidité relative.

I.2. Souches de bactéries

Nous avons utilisé pour cette étude deux souches d'*Escherichia coli* :

La souche de bactérie compétente JM109 « High Efficiency » (Proméga) (de génotype *endA1*, *recA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17* (r_k^- , m_k^+), *relA1*, *supE44*, Δ (*lac-proAB*), [*F'* *traD36*, *proAB*, *laqI*^q Δ M15]), est utilisée pour cloner les fragments d'ADN en vue de les séquencer.

La souche DH5 α (de génotype *F*- ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *deoR* *recA1* *endA1* *hsdR17* (r_k^- , m_k^+) *phoA* *supE44* *thi-1* *gyrA96* *relA1* λ^-), est utilisée pour l'amplification des plasmides lors du clonage par la méthode Gateway.

Ces deux souches portent le gène *lacZ*, permettant la sélection par criblage bleu/blanc sur milieu contenant du XGal.

I.3. Souches de levure

La souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* utilisée pour l'expression des différentes protéines et la détection d'interaction est la souche MaV203 de génotype (MAT α , *leu2-3*, 112, *trp1-901*, *his3* Δ 200, *ade2-101*, *gal4* Δ , *gal80* Δ , SPAL10:URA3, GAL1:*lacZ*, HIS3_{UASGALI}:HIS3LYS2, *can1*^R, *cyh2*^R) (Vidal, 1997). Elle est délétée pour les gènes GAL4 et GAL80 pour éviter toute interférence avec le gène GAL4 exogène. Elle est auxotrophe pour

3 acides aminés : leu, trp et his et pour l'uracile (ura) et contient trois gènes rapporteurs : lacZ, HIS3 et URA3. Les régions régulatrices de ces gènes contiennent des séquences UAS (Upstream Activating Sequence), éléments de régulation reconnus par le domaine de fixation de l'ADN de GAL4.

I.4. Plasmides

I.4.1. Plasmide pGEM®-T Easy

Nous avons utilisé pour le clonage et le séquençage des fragments d'ADN, le vecteur pGEM®-T Easy de promega (**Fig. 14**). Commercialisé sous forme linéaire, le vecteur pGEM®-T Easy, présente à chaque extrémité une thymidine compatible à l'adénosine, ajoutée en 3' par la Taq polymérase, lors de l'amplification des fragments d'ADN. Ce plasmide est porteur du gène LacZ permettant l'alpha complémentation et donc la sélection des clones par criblage bleu/ blanc, en présence d'IPTG et de X-GAL (Ullmann et al, 1967).

I.4.2. Plasmide pDONR™221

Le plasmide pDONR221 (4762 pb) d'Invitrogen (**Fig. 15**), est le vecteur d'entrée utilisé par la technologie Gateway. Il est porteur du gène de résistance à la kanamicine, marqueur de sélection et possède des séquences de recombinaison *attP1* et *attP2* permettant le clonage des produits PCR amplifiés avec des amorces spécifiques de cette technique.

I.4.3. Plasmide d'expression

Nous avons utilisée également deux vecteurs commercialisés par Invitrogen le pDEST22 (**Fig. 16a**) et le pDEST32 (**Fig. 16b**).

Le vecteur pDEST22 (8923 pb) porte le gène de résistance à l'ampicilline et permet l'expression d'une protéine de fusion couplée au domaine de fixation à l'ADN du facteur de transcription GAL4.

Le vecteur pDEST32 (12288 pb) porte le gène de résistance à la gentamycine et permet l'expression d'une protéine de fusion couplée au domaine d'activation du gène GAL4.

I.5. Acides nucléiques

Les amorces utilisées pour les études d'expression par RT-PCR sont citées dans le **Tableau 4**.

I.6. Milieux de culture

Les milieux de culture sont stérilisés par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes. Les milieux solides contiennent 1.5% d'agar.

I.6.1. Milieu de culture des bactéries

Nous avons utilisé le milieu LB pour la culture des bactéries dont la composition est la suivante :

Milieu LB : 1% Tryptone, 0,5% extrait de levure, 0,5% NaCl 1M.

Afin de rendre ce milieu sélectif aux plasmides du double hybride après la transformation des bactéries, on ajoute, 50 µg/ml de kanamycine, 10 µg/ml de gentamycine et 100 µg/ml d'ampicilline. Pour la sélection des clones par criblage bleu/blanc, 1 ml d'ampicilline à 50 mg/ml, 1 ml d'X-Gal 100 mM et 300 µl d'IPTG 20% sont ajoutés au milieu LB.

I.6.2. Milieux de culture des levures

Nous avons utilisé deux types de milieux pour la culture de levures dont la composition est la suivante :

Milieu YPAD :

YPD : 5% (p/v)

Adénine sulfate : 0,08% (p/v)

Milieux Synthétiques complets-leu-trp (Sc-leu-trp) :

Yeast Nitrogen Base : 0,17% (p/v) Drop out w/o leu et trp : 0,15% (p/v)

Ammonium sulfate (NH₄)₂SO₄ : 0,5% (p/v)

40% glucose

II. METHODES

II.1. Etude bioinformatique

La recherche des séquences correspondant au différent gène du complexe SCF du blé, a été réalisée au moyen des bases de données NCBI, National Centre for biotechnology information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) et TIGR, (<http://www.tigr.org/db.shtml>) qui intègrent une quantité de données sur les séquences de plusieurs espèces végétales. les alignements multiples des séquences et les pourcentages d'identité ont été réalisé grâce, à des logiciels disponibles gratuitement sur internet : BlastN pour l'alignement des séquences nucléotidiques et BlastP et TblastP pour les séquences protéiques (Altschul et al, 1997). Enfin les séquences homologues ont été regroupées en contig par des logiciels d'assemblage comme ceux de CAP3 (Huang and Madan, 1999) qui recherche les parties communes aux différents fragments pour les assembler.

II.2. Méthodes générales de biologie moléculaire

II.2.1. Extraction des acides nucléiques

II.2.1.1. Extraction d'ADN

La méthode d'extraction d'ADN utilisée est adaptée du protocole décrit par Saghai-Maroo et *al.* en 1984.

Une lyse cellulaire est réalisée à l'aide de moyens physiques et chimiques. Les échantillons broyés dans l'azote liquide sont soumis à un certain nombre de traitements :

- solubilisation des membranes cellulaires par le CTAB,
- inhibition des désoxyribonucléases par l'EDTA,
- élimination des ARN par l'emploi de RNases A
- déprotéinisation par traitement à la protéinase K et extraction des protéines au chloroforme/alcool iso-amylque,
- précipitation des ADN à l'alcool éthylique,
- purification de l'ADN à l'aide de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (IAA) et de chloroforme neutre pour éliminer les traces de phénol,

- précipitation des ADN à l'isopropanol, lavage du culot à l'éthanol 70% et solubilisation de l'ADN dans du TE (Tampon d'Elution).

II.2.1.2. Extraction d'ARN

Les échantillons de tissus congelés à -80°C ou prélevés immédiatement sur des plantules adultes, sont pesés et broyés dans de l'azote liquide. Les membranes cellulaires sont solubilisées dans un tampon borate basique pendant 5 minutes à 65°C . Après addition de phénol acide les échantillons sont centrifugés 15 minutes à 14 000 rpm à 4°C afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est récupéré et du phénol/chloroforme/IAA est ajouté (900 μl) et les tubes sont centrifugés 15 minutes à 14 000 rpm à 4°C . Les échantillons sont par la suite traités par le chloroforme neutre pour éliminer les traces de phénol. Les ARN totaux sont alors présents dans la phase aqueuse supérieure, tandis que l'ADN se trouve dans la phase phénolique et les protéines à l'interface. Après récupération de la phase aqueuse, les ARN sont précipités par addition d'un volume d'isopropanol et sont laissés 2 heures à -80°C puis centrifugés 30 minutes à 14 000 rpm à 4°C . Après élimination de l'isopropanol par aspiration sous vide, le culot d'ARN est lavé à l'éthanol froid, séché puis solubilisé dans de l'eau et traité par le chlorure de lithium pour précipiter les ARN de haut poids moléculaire. Les ARN sont conservés à -20°C . Une électrophorèse sur gel d'agarose 1% permet de vérifier l'intégrité des ARN extraits à travers l'observation des bandes correspondant aux ARNr 18S et 28S. La contamination des ARN par des protéines est vérifiée par le rapport des densités optiques à 260 et 280 nm (le rapport doit être compris entre 1,8 et 2). La concentration des ARN totaux est obtenue par la mesure de la densité optique à 260 nm (1 unité de densité optique correspondant à une concentration de 40 $\mu\text{g/ml}$).

II.2.2. RT-PCR semi-quantitative

II.2.2.1. Principe de la méthode

La RT-PCR représente une méthode sensible pour détecter l'accumulation d'un ARNm dans un tissu, à la suite de différents traitements.

Le principe consiste à extraire les ARN totaux des tissus étudiés et de les copier *in vitro* en ADNc simple brin grâce à l'action de la transcriptase reverse. Les molécules obtenues servent alors de matrice à une réaction PCR en utilisant un couple d'amorces spécifiques de la

séquence de l'ARN d'intérêt. Les fragments PCR obtenus sont ensuite visualisés sur gel d'électrophorèse. L'une des difficultés de la technique est la contamination de la préparation d'ARN par de l'ADN génomique d'où le traitement des échantillons d'ARN par de la DNase (Tagu, 1999).

II.2.2.2. Transcription inverse (RT) des ARNm en ADNc

Un kit commercial a été utilisé pour l'obtention d'ADNc à partir des ARNm (SuperscriptTM II Reverse Transcriptase (Invitrogen)). 3 µg ARN totaux sont dénaturés en présence de 1 µl d'Oligo dT (0,5 µg) à 65°C pendant 5 minutes. Par la suite, L'ADNc est généré en ajoutant 0,25 µl de transcriptase inverse Superscript II (50U) dans 4 µl de tampon réactionnel 5X, 1 µl de dNTP 10 mM, 2 µl de DTT 0,1 mM complété par 0,75 µl d'eau stérile pour un mélange réactionnel égale à 8 µl. Le milieu est mis à incuber 60 minutes à 42°C (activation de la rétrotranscriptase) et 10 minutes à 75°C (dénaturation de l'enzyme). Ainsi, tout le pool d'ADNc est obtenu. Pour éliminer les structures doubles brin ARN-ADNc un traitement à la ribonucléase H (RNase H) 1U/1 µl, a été effectué sur les échantillons d'ADNc.

II.2.2.3. Amplification des ADNc

Une PCR (Polymérase Chain Reaction) est réalisé sur les ADNc obtenus après transcription inverse. Cinq µl d'ADNc formés sont amplifiés par PCR en utilisant le mélange réactionnel suivant :

Tampon 10X (Ozyme)	2 µl
Amorce 5' 10 µM	0,5 µl
Amorce 3' 10 µM	0,5 µl
dNTP 25 mM	0,16 µl
Taq polymérase 2U (clontech)	0,4 µl
H ₂ O ultra pure	qsp 20 µl

Le programme PCR est constitué par trois étapes distinctes, représentées par le schéma suivant. La première est caractérisée par la dénaturation initiale de l'ADNc. La deuxième étape est constituée par 3 phases, répétées de 25 à 40 fois qui sont respectivement la

dénaturation de l'ADN, l'hybridation des amorces sous une température T_m adéquate et l'élongation par la Taq polymérase. Puis la PCR se termine par une étape d'élongation finale.

94°C	5 min.	} 25 à 40 cycles
94°C	30 s	
$\theta^\circ\text{C } T_m$	30 s	
72°C	1'30 s	
72°C	7 min.	
4°C	∞	

II.2.3. Purification de fragments d'ADNc sur gel d'agarose

Les produits de la PCR sont ensuite mis à migrer sur un gel d'agarose à 1%. La bande correspondant aux fragments d'ADN de taille attendue est découpée et les fragments sont purifiés grâce au kit GFX : une solution tampon contenant de l'acétate et des agents chaotropiques, dissolvent l'agarose et facilitent l'accrochage de l'ADN double brin (100 pb à 48 kpb) sur la matrice en fibre de verre des colonnes GFX. Une solution de lavage contenant du tampon Tris-EDTA (10 mM tris-HCL pH 8, 0,5 mM EDTA) additionné d'éthanol absolu permette le lavage de l'échantillon retenu par la fibre de verre. Une fois purifié, l'ADN est élué par un tampon de force ionique faible comme le TE ou l'eau (10 μL minimum selon la concentration souhaitée).

II.2.4. Clonage

Après sélection et repiquage des colonies positives dans un milieu nutritif toute la nuit à 37°C, la présence et la taille de l'insert sont vérifiées par PCR en utilisant un couple d'amorces spécifiques du vecteur, appelées SP6/T7. Si l'insertion a véritablement eu lieu, on aura ainsi un amplicon encadré de deux portions de séquences du vecteur. Après migration sur gel d'agarose 1% des produits de PCR, on identifie les clones ayant inséré le fragment d'intérêt grâce au marqueur de poids moléculaire.

II.2.5. Séquençage

Des solutions de culture bactériennes ayant inséré le fragment d'intérêt sont envoyées à la société Cogenics (Grenoble, France) pour séquençage. Une partie des inserts est séquençé à partir de l'extrémité SP6 et/ou de l'extrémité T7 du plasmide pGEM®-T Easy.

II.2.6. Analyse des séquences

Le programme de comparaison BLAST (Basic Local Alignment Search Tools) (Altschul et al, 1990 ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) est utilisé pour rechercher dans différentes bases de données des séquences ou des régions fortement homologues à nos séquences nucléotidiques obtenues. L'alignement des séquences et l'estimation du pourcentage d'identité sont effectués par le biais du programme Clustalx (Higgins and Sharp, 1989). Ces analyses de séquences permettent de déterminer la nature du gène cloné. Enfin, une analyse par BLASTp (séquence protéique déduite de la séquence nucléotidique) permet de déterminer si nous sommes en présence d'une séquence codante.

II.3. Traitements et prélèvements

Lorsqu'une séquence ADNc clonée correspondant à un gène a été identifiée et annotée comme ayant la fonction attendue, les amorces de PCR qui ont permis son amplification peuvent être utilisées pour l'étude de l'expression de ce gène par PCR. Pour cela, nous avons traité des lots de plantules par deux solutions hormonales, extrait et analysé par RT-PCR les ARN totaux de ces plantules. Il s'agit d'une analyse semi-quantitative.

Nous avons utilisé 2 phytohormones : le 2,4-Dichlorophénoxyacetic acid (2,4 D) et l'acide gibbérellique (GA3). Les solutions de phytohormones (2,4-D 45 μ M et GA3 10⁻⁴ M) ont été préparées par dissolution des poudres dans de l'éthanol, puis ajout d'eau ultra pure (Annexe 3).

Nous avons pulvérisé les solutions de phytohormones sur les parties aériennes et nous avons réalisé un lot de plantules non traitées, et un lot de plantules traitées avec de l'eau. Les plantules sont traitées après 15 jours de mise en culture, puis prélevées par coupure au scalpel à la base des racines, selon une cinétique de 6 temps (t) : t 0, t 2 heures, t 6 heures, t 10 heures, t 24 heures et t 48 heures. Les plantules coupées sont immédiatement plongées dans

l'azote liquide, puis broyées au mortier dans l'azote liquide. Les broyats de plantules peuvent être conservés à -80°C.

II.4. Stratégies de clonage *in vitro* et expression des protéines : technologie GATEWAY

II.4 .1. Principe du clonage GATEWAY

La stratégie, que nous avons retenue pour le clonage des différent gènes étudiés est la technique de recombinaison *in vitro*, GATEWAY™, commercialisée par la société *Invitrogen*. Cette technologie, s'inspire du processus naturel d'intégration/excision du bactériophage lambda dans le génome d'*Escherichia coli* (Earley et al, 2006).

Les sites naturels de recombinaisons attB, attL, attR et attP ont été modifiés de façon à augmenter l'efficacité des enzymes impliquées dans la recombinaison et à permettre un clonage directionnel (Cheo et al, 2004).

La première étape du clonage consiste à obtenir le gène à cloner avec, à chacune de ses extrémités, deux sites de recombinaison attB : attB1 et attB2. Ces deux sites sont légèrement différents l'un de l'autre, ce qui permet d'assurer tout au long du processus un clonage directionnel. Cette opération est réalisée par une réaction de PCR utilisant un couple d'amorces dont les extrémités 5' et 3' comportent les séquences attB1 et attB2 associées à des séquences spécifiques du gène d'intérêt. Le produit PCR est ensuite sous-cloné dans un vecteur d'entrée, contenant les sites attP (attP1 et attP2) par une première réaction de recombinaison appelée recombinaison BP. On obtient alors un « clone d'entrée » dans lequel le gène d'intérêt est maintenant flanqué de deux sites attL notés attL1 et attL2. Le produit de cette deuxième étape, définissant un clone d'entrée, est isolé, après transformation et sélection sur milieu sélectif, pour être incubé avec le vecteur de destination. Ce vecteur est muni des sites attR1 et attR2 recombinant spécifiquement avec les sites attL1 et attL2, permettant ainsi l'obtention d'un « clone d'expression » (**Fig. 17**). Le produit de cette troisième et dernière étape est utilisé pour transformer les souches bactériennes (Hartley et al, 2000).

Les protéines recombinantes produites possèdent, à leur extrémité N-terminale, une séquence additionnelle de 21 résidus d'acides aminés surnuméraires par rapport à la protéine native, comprenant l'étiquette et la séquence de recombinaison attB1.

II.4.2. Préparation des fragments d'intérêt à cloner

II.4.2.1. Dessin des amorces

Le gène d'intérêt est amplifié par PCR à l'aide d'une amorce sens contenant la séquence spécifique de recombinaison attB1 et d'une amorce anti-sens contenant la séquence spécifique de recombinaison attB2 (**Tableau 5**).

Les amorces attB sont dessinées de la manière suivante :

- amorce Forward, attB1 :

5'- GGGG**ACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTC**ATG + Séquence spécifique du gène -3'

- amorce Reverse, attB2 :

5'- GGGG**ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC**+ Séquence spécifique du gène -3'

Les amorces devront contenir les structures suivantes:

- 1- 4 G en 5' permettant d'augmenter la température d'hybridation donc la spécificité,
- 2- les séquences attB de 25 pb chacune,
- 3- les séquences TC pour l'amorce sens (For) et C pour l'amorce antisens (Rev) permettant de conserver le cadre de lecture,
- 4- un codon d'initiation ATG (ATG du gène d'intérêt ou non) pour l'amorce sens permettant la traduction de la protéine,
- 5- l'amorce spécifique du gène est composée de 18 à 25 pb,
- 6- un codon stop après le C pour l'amorce antisens.

II.4.2.2. PCR recombinante

Une PCR a été réalisée sur 2 µl de produits RT en utilisant le mélange réactionnel standard avec les amorces attB. Le programme d'amplification utilisé est le suivant :

95°C	4 min	} 40 CYCLES
94°C	20s	
58°C à 60°C	30s	
72°C	1 min à 3 min	
72°C	7 min	

Le produit PCR est déposé sur gel d'agarose pour pouvoir le purifier par le kit GFX. Ensuite les éluas ont été dosés au nanodrop à 260 nm, 280 nm et 230 nm pour estimer la quantité et la qualité des fragments purifiés.

II.4.3. Réaction de recombinaison BP

La réaction de recombinaison BP permet le clonage d'un fragment d'ADN-attB dans le plasmide donneur par simple recombinaison homologue. Pour faire cette réaction, il est conseillé d'utiliser autant de produit PCR-attB que de vecteur donneur (pDONR221) soit 50 fmol.

Pour le vecteur 50 fmol correspondent à 150 ng. Pour le fragment d'intérêt il faut utiliser la formule de conversion suivante :

$$\text{ng} = (50 \text{ fmol}) \times (N) \times \left[\frac{660 \text{ fg}}{1 \text{ fmol}} \right] \times \left[\frac{1 \text{ ng}}{10^6 \text{ fmol}} \right]$$

N est la taille du fragment à cloner en paires de bases.

La réaction est donc réalisée en utilisant 50 fmol de fragment PCR-attB et 150 ng/μl de vecteur pDONR en présence de 2 μl de BP Clonase II enzyme et du tampon TE Buffer, (pH = 8,0) dans un volume final de 10 μl. La ligation a lieu à 25°C pendant au moins 18 heures.

II.4.4. Transformation criblage et purification

Le tube contenant les cellules compétentes *E. Coli* One Shot DH5α est laissé à dégeler 15 minutes dans la glace. 1 μl de produit issu de la recombinaison BP est ajouté à 50 μl de DH5α. Après 30 minutes à 4°C, le tube est placé dans un bain à 42°C pendant 20 secondes (choc thermique). Les cellules sont alors remises 2 minutes dans la glace, puis 250 μl de milieu SOC stérile à température ambiante sont rajoutés. Après 1 h d'incubation horizontale à 37°C sous une agitation de 250 rpm, les cellules sont étalées sur un milieu de culture LB agar additionné de 50μg/ml d'Ampicilline. Une nuit à 37°C suffit pour l'obtention de colonies.

Le vecteur d'entrée recombinant, est ensuite vérifié par amplification PCR en utilisant les amorces M13, suivie d'un dépôt sur gel d'agarose. Ensuite les plasmides ont été isolés par mini-préparation. Enfin, la construction est vérifiée par séquençage.

II.4.5. Réaction de recombinaison LR

Le produit de cette première recombinaison, appelé vecteur d'entrée, sert de matrice à une seconde recombinaison, réaction de recombinaison LR, avec des vecteurs de destination (pDEST22 et pDEST32) pour obtenir les vecteurs d'expression de protéines. Ainsi nous avons incubé dans un microtube, 150 ng du clone d'entrée, 150 ng/μl du vecteur de destination, 2 μl de LR Clonase II enzyme mix et du tampon TE Buffer, dans un volume final de 10 μl. Le mélange est alors incubé 18h à 25°C.

II.4.6. Transformation, criblage et purification

Les clones d'entrée sont également introduits dans les bactéries *E. Coli* DH5α compétentes par choc thermique. Ensuite les bactéries sont étalées sur milieu de culture LB agar additionné de 10 μg/ml de Gentamycine pour le plasmide pDEST32 et 100 μg/ml d'Ampicilline pour le plasmide pDEST22. Après avoir effectué une incubation une nuit à 37°C, l'insertion des fragments d'intérêt est vérifiée par amplification PCR, pour être par la suite purifier et stocker.

II.5. Etude de l'interaction protéine-protéine : technique du double-hybride

II.5.1. Principe du double-hybride

La technique du double-hybride (Y2H) exploite les propriétés modulaires de certaines protéines. Il existe chez ces protéines des domaines fonctionnels distincts et indépendants. Par exemple, les activateurs d'expression de gène (facteur de transcription) ont généralement un domaine de liaison à l'ADN essentiel à la liaison de l'activateur sur son promoteur cible. Ils ont aussi une région responsable dans l'élévation du niveau de transcription d'un gène : le domaine d'activation (Hope, 1986 ; Keegan et al, 1986).

Il est possible de fusionner un domaine d'activation à un domaine de liaison à l'ADN et de reproduire l'effet de la protéine entière dans des systèmes de transcription *in vitro*.

Le système double-hybride d'*Invitrogen* exploite les propriétés modulaires du facteur de transcription GAL4 de la levure, constituée d'un domaine de liaison de l'ADN et d'un domaine d'activation de la transcription. Le domaine de fixation à l'ADN de GAL4 est incapable d'activer la transcription d'un gène à moins que physiquement, il ne soit associé au

domaine d'activation. Ainsi l'expression de deux protéines chimères, l'une associée au domaine de fixation GAL4-BD (protéine « appât ») et l'autre associée au domaine d'activation GAL4-AD (protéine « proie »), permet si les deux protéines interagissent de reconstituer un facteur de transcription fonctionnel et résulte en l'expression des gènes rapporteurs dont le promoteur est sous le contrôle du facteur de transcription (**Fig. 18**).

II.5.2. Construction des protéines de fusion « Appât » et « Proie »

Le clonage GATEWAY nous a permis d'obtenir des protéines de fusion « Appât » et « Proie ». Pour la réaction de recombinaison LR, nous avons utilisé le vecteur pDEST32 pour obtenir une protéine de fusion «Appât», associé au domaine de liaison à l'ADN GAL4-BD, et le vecteur pDEST22 nous a permis d'obtenir une protéine de fusion «Proie», associé au domaine activateur de la transcription, GAL4-AD.

Nous avons réalisé, pour chaque gène, les deux constructions pour tester les deux sens d'interaction.

II.5.3. Préparation de cellules de levures compétentes

La préparation des levures compétentes consiste à l'obtention de levures sans paroi pour permettre leur co-transformation par les plasmides. Une colonie de levure MaV203 est ensemencée en stries sur un milieu YPAD pendant 48h à 30°C. Ensuite une colonie isolée est repiquée dans 10 ml de milieu YPAD liquide et incubée 16h à 30°C sous une agitation de 225 rpm. Après mesure de DO à 600 nm, $0,510^8$ /ml de cellules sont transférées dans 10 ml de milieu complet YPAD pour ensuite être incubées à 30°C pendant 3 à 6 heures. Lorsque la DO_{600nm} est égale à 0,02, la culture est centrifugée 5 minutes à 500 g à température ambiante et le culot est resuspendu dans 10 ml de solution I (Kit Sc EasyComp, *Invitrogen*). La centrifugation est répétée et le culot est finalement repris dans un volume final de 1 ml de solution II (Kit Sc EasyComp, *Invitrogen*).

II.5.4. Co-transformation des protéines de fusion dans la levure

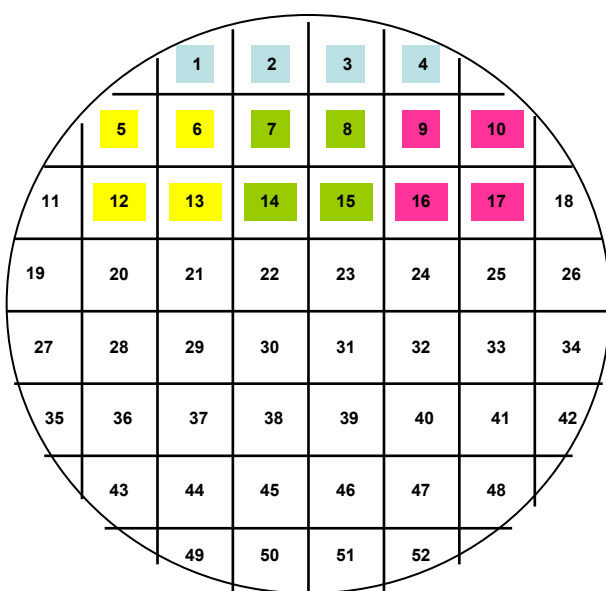
Un volume de 50 µl de levure, a été transformé avec un couple de protéines (250 ng de chaque vecteur), dont nous avons voulu identifier l'interaction. Tout d'abord, 500 µl de la solution III (Kit Sc EasyComp, *Invitrogen*) a été ajouté aux cellules. Ensuite, on laisse incubé

1h à 30°C, en vortexant tous les quart d'heure, afin d'augmenter l'efficacité de transformation.

Les cellules sont par la suite étalées sur un milieu sélectif Sc-leu-trp et les boîtes sont incubées à 30°C pendant quelques jours (2 à 4 jours), jusqu'à l'apparition des colonies.

II.5.5. Criblage des transformants

Sous la hotte à flux laminaire, nous avons repiquée les transformants (colonies qui se sont développées sur le milieu sélectifs) sur un nouveau milieu sélectif Sc-leu-trp en présence d'échantillons témoins selon le schéma suivant :



- n°1 à 4 : témoins « forte interaction » (Krev1/RalGDSwt)
- n°5, 6, 12, 13 : témoins « faible interaction » (Krev1/RalGDSm1)
- n°7, 8, 14, 15 : témoins « pas d'interaction » (Krev1/RalGDSm2)
- n°9, 10, 16, 17 : témoins « vecteurs vides » (pDEST32/pDEST22)
- n°19 à 52 : colonies « transformants » à tester

II.5.5.1. Test X-gal

Sur les trois gènes rapporteurs qui existe dans la levure. Nous avons exploité pour notre étude le gène rapporteur LacZ, qui permet de voir et de quantifier la force d'interaction entre la protéine « proie » et « appât ». Le test X-Gal, permet donc de détecter l'interaction grâce à la traduction du gène LacZ codant pour la β -galactosidase. Des transformants sont repiqués sur un filtre de nitrocellulose déposé sur un milieu riche YPAD pendant 48h à 30°C. Les cellules sont par la suite cassées en plongeant le filtre 30 secondes dans de l'azote liquide. Le filtre est alors déposé sur deux disques de papiers Whatman 541 imbibé de 10 ml de la solution Z (16,1 g/l Na₂HPO₄ 7H₂O ; 5,5 g/l NaH₂PO₄ H₂O ; 0,75 g/l KCl ; 0,246 g/l MgSO₄ 7H₂O ; pH 7) supplémenté de 100 μ l de X-Gal à 10 mg/ml et de 60 μ l de β -

mercaptoéthanol. Le filtre est ensuite incubé à l'étuve, à 30°C jusqu'à apparition de la couleur bleue.

II.5.5.2. Test CPRG

Il est possible de quantifier la β -galactosidase induite dans les cellules de levure en utilisant le test CPRG en milieu liquide. Les clones positifs (bleus) ainsi que les témoins, sont repiqués dans 5 ml de milieu Sc-leu-trp et mis à incuber 16 à 18h à 30°C. Les cellules sont ensuite transférées sur un milieu YPAD pour être Incuber de 3h à 5h à 30°C, sous une agitation de 250 rpm. Lorsque la DO_{600nm} atteint une valeur de 0,5 à 0,8, chaque culture est transférée dans 3 microtubes (triplicats), centrifugés 30s à 14000 rpm et les culots sont repris dans 300 μ l de tampon I (Annexe 1). Les cellules sont finalement lysées par une série de congélation (azote liquide)/décongélation (bain-marie à 37°C) et 700 μ l de tampon II (Annexe 1) sont ajoutés à chaque échantillon. Les échantillons sont incubés à température ambiante. Lorsque la couleur passe du jaune au rouge on ajoute 0,5 ml de $ZnCl_2$ 3 mM pour arrêter la réaction et on note le temps. Les cellules sont alors centrifugées 1 min à 14 000 rpm pour culotter les débris cellulaires et transférés dans des cuves à spectrophotométrie pour être doser à 578 nm.

II.5.6. Analyse des résultats

La β -galactosidase est une enzyme qui catalyse l'hydrolyse du lactose en glucose et galactose. Elle hydrolyse aussi leurs substrats synthétiques tels que le X-Gal ou le chlorophénol red- β -D-galactopyranoside (CPRG).

Quand le substrat, X-Gal, est clivé par l'enzyme β -galactosidase, on observera une coloration bleue foncée pour les interactions fortes et intermédiaires, bleue claire pour les interactions faibles et aucune coloration lorsqu'il n'y a pas d'interaction. Pour les interactions fortes, nous avons observé une coloration bleue dès 20 min d'incubation (compter 30 à 60 min pour le témoin +++ Krev1/Ral GDS). Alors que les interactions faibles ne sont visible qu'au bout de 24h (témoin + Krev1/Ral GDS m1).

Pour le Test CPRG, quand le Chlorophénol red- β -D-galactopyranoside (CPRG) est clivé par l'enzyme β -galactosidase, on obtient un produit rouge, soluble dans l'eau et mesurable par spectrophotométrie : le Chlorophénol red. L'activité de la β -gal dans la

solution peut alors être quantifiée en déterminant la quantité de substrats convertis à 570-595 nm (570 nm étant la valeur maximale d'absorbance).

Une unité de β -galactosidase est définie comme la quantité d'enzymes nécessaire à l'hydrolyse d'1 μ mol de CPRG en Chlorophenol red et D-galactose par minutes et par cellules (Miller, 1972 ; Miller, 1992) :

$$\beta\text{-galactosidase units} = 1000 \times DO_{578} / (t \times V \times DO_{600})$$

t = temps d'incubation nécessaire au développement de la couleur rouge

V = 0,1 x facteur de concentration

DO_{600ou578} = absorbance à 600 ou 578 nm de 1 ml de culture

II.6. Détection spécifique des protéines : technique du western-blot

II.6.1. Extraction de protéines totales à partir des levures

Pour l'extraction des protéines à partir des levures nous avons suivi le protocole décrit par (Printen and Sprague, 1994). La pré-culture de levure est lancée durant 16 à 18h dans un milieu sélectif Sc-leu-trp à 30°C sous une agitation de 230 à 270 rpm. Le lendemain, les cellules sont ensemencées dans le milieu YPAD puis laissées pendant quatre à huit heures à 30°C sous agitation, afin d'obtenir une DO_{595} entre 0,4 et 0,6. Les échantillons sont coulés dans des tubes refroidis dans la glace et collectés par centrifugation dans de l'eau stérile froide pour être finalement plongés dans de l'azote liquide. Ensuite le culot est repris dans un volume de cracking buffer, équivalent à 100 μ l pour 7,5 unités de densité optique. Puis, les cellules sont transférées dans des tubes contenant des billes en verre et l'ensemble est chauffé à 70°C pendant 10 minutes. Les cellules sont par la suite cassées par agitation au vortex pendant 1 min et les surnageants sont récupérés par des centrifugations entre lesquelles les tubes sont chauffés à 100°C sur une plaque chauffante.

II.6.2. Electrophorèse dénaturante

Les protéines de levure sont chauffées pendant 5 à 10 minutes, puis séparées par électrophorèse en conditions dénaturantes à l'aide d'un gel de polyacrilamide/SDS 10% selon la technique "SDS-PAGE" décrite par Laemmli (Laemmli, 1970). Les protéines migrent

successivement à travers deux gels. Un premier gel de concentration, faiblement concentré en acrylamide (Acrylamide-bisacrylamide 4% ; 40% T 5% C, 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 et SDS 10%). Le second gel dit de séparation est plus concentrée en acrylamide (10%) (Acrylamide-bisacrylamide 10%, 40% T 5% C, 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 et SDS 10%) et il permet de séparer les protéines selon leur taille.

La migration a lieu pendant 30 minutes à 80V dans le gel de concentration, puis 1H30 à 200V à travers le gel de séparation dans le tampon de migration.

Après migration, le gel peut être coloré 30 minutes dans une solution de bleu de Coomassie. Les protéines sont ensuite visualisées après plusieurs lavages dans des bains de décoloration.

II.6.3. Transfert sur membrane de nitrocellulose

Pour les analyses de western-blot, une fois la migration terminée, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Amersham). Nous avons utilisé la méthode de transfert "semi-sec", le gel est placé contre une membrane de nitrocellulose préalablement trempée dans du tampon de transfert. Le gel et la membrane sont placés entre deux couches de trois papiers Whateman également imbibés dans le tampon de transfert. L'ensemble est pris en sandwich entre deux électrodes et donc sous l'influence d'un champ électrique, les protéines vont migrer de l'anode vers la cathode. Le transfert est effectué sous un voltage maximum et un ampérage à raison de 0,8 mA par cm² de membrane.

Pour vérifier si l'électrophorèse et le transfert se sont bien passés, la membrane est incubée dans le rouge Ponceau pour colorer les bandes de protéines.

II.6.4. Détection immunologique

Pour détecter la présence des protéines de fusion avec le domaine de fixation à l'ADN, GAL4-BD, nous avons utilisé des anticorps monoclonaux qui se fixent à l'étiquette GAL4-BD. La membrane de nitrocellulose est saturée avec une solution de régilait pendant 1h, sous agitation, à température ambiante. La membrane est ensuite rincée 1 fois 15 minutes et 2 fois 10 minutes dans une solution de TBS-T et placée pendant deux heures dans la même solution contenant 3 µg/µl d'anticorps primaire anti-GAL4-BD. L'excès d'anticorps est éliminé en réalisant les trois lavages successifs et la membrane est incubée dans une solution de TBS-T contenant l'anticorps secondaire (anticorps anti-HRP de souris) diluée au 1/10 000. La

membrane est finalement rincée 1 fois 15 minutes et 2 fois 10 minutes dans une solution de TBS-T et les protéines reconnues par l'anticorps sont révélées par le kit ECL (Enhanced Chemiluminescence, Amersham). Les solutions de révélation R1 et R2 sont ajoutées volume à volume, à raison de 0,8 ml par cm² de membrane pendant 1 minute.

II.7. RT-PCR quantitative

II.7.1. Principe

La PCR en temps réel ne diffère pas fondamentalement d'une réaction de PCR classique. La réaction se déroule *in vitro* en présence de matrice (ADNc), des amorces, de dNTP et d'une enzyme polymérase et afin de s'affranchir des erreurs éventuelles (dépôt d'ARN, pipetage, etc...), nous avons utilisé le kit IQ sybergreen supermix (Biorad).

C'est un mélange réactionnel classique auquel est ajouté un marqueur spécifique de l'ADN double brin, le SYBR® Green. Ce marqueur, en se liant à l'ADN double brin émet une quantité de fluorescence directement proportionnelle à la quantité d'ADN présente dans le tube. Ainsi, au cours des différents cycles de PCR, la fluorescence émise augmente parallèlement à la quantité d'ADN synthétisée. L'intensité de la fluorescence est enregistrée et quantifiée à chaque cycle, en « temps réel », et il est ainsi possible de visualiser la cinétique d'amplification de chaque PCR. On fixe ensuite un signal seuil (Threshold) commun à toutes les réactions de PCR qui doit se situer en début de phase exponentielle, lorsque le signal sort du bruit de fond, car c'est à ce moment que la variabilité de la réaction est la plus faible et que les quantités de réactifs ne sont pas limitantes. Le nombre de cycles de PCR pour atteindre ce seuil (Ct pour Cycle threshold) est alors déterminé. Le Ct correspond au nombre de cycles requis pour atteindre un point où le signal d'émission de fluorescence sera statistiquement et significativement plus élevé que le bruit de fond. Autrement dit, la valeur de Ct correspond à un niveau de fluorescence suffisamment bas pour que les courbes d'amplification soient en phase exponentielle mais suffisamment élevée pour être au dessus du bruit de fond.

Les réactions d'amplification sont réalisées en triplicata et l'écart entre deux valeurs de Ct est jugé acceptable lorsqu'il est inférieur à 0,4. Dans ce cas, la valeur de Ct utilisée pour les calculs est la moyenne des Ct des triplicatas.

Pour avoir une valeur exacte de la quantité de notre gène cible nous avons normalisé les valeurs en se référant à un gène exprimé de façon constante quelle que soit la situation

testée. Dans notre cas nous avons utilisé le gène de référence actine, dont l'expression est généralement ubiquitaire.

II.7.2. Prélèvement des échantillons

Trois lots de 30 plantes ont été cultivés à l'intervalle d'une semaine (3 répétitions biologiques) et les échantillons de feuilles tiges et racines ont été prélevé sur des plantules de 14 jours.

II.7.3. Conditions de PCR

Les PCR en temps réel sont réalisées grâce à un thermocycler : l'iCycler iQr (Bio-Rad). Les analyses de PCR semi quantitatives des différents gènes étudiés, sont effectuées à partir de 10 µl d'ADNc dilués (dilution spécifique à chaque gène étudié) en utilisant le kit iQtm SYBR® Green PCR Supermix (Bio-Rad). Le volume final de réaction de PCR est de 23 µl, contenant 1 µl d'amorces à 10 µM. La séquence des amorces utilisées et leur température d'hybridation pour l'amplification de chaque gène d'intérêt sont listées dans le **Tableau 1**. Les échantillons sont incubés à 95°C pendant 10 minutes pour activer l'ampliTaq Gold DNA polymérase, puis 40 cycles de PCR sont effectués. Chaque cycle de PCR consiste à chauffer à 95°C pendant 10 minutes pour dénaturer l'ADN, puis à 55°C pendant 30 secondes pour l'hybridation des amorces et l'élongation de l'ADN. A la fin du dernier cycle de PCR, l'ADN double brin est dénaturé par un gradient de température croissant de 0,5°C/10 sec de 55 à 94°C, pour obtenir une courbe de fusion spécifique de la séquence d'ADNc amplifiée. Le pic de fusion est obtenu par la dérivée de la courbe de fusion et met en évidence le T_m spécifique de chaque amplicon. L'observation d'un pic unique par espèce amplifiée permet de s'assurer de l'absence de contamination.

II.7.4. Efficacité de PCR

Une gamme de dilution réalisée (pur, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32) en triplicat à partir d'un pool de tous les échantillons pour chaque tissu (feuille, tige et racine), est amplifiée simultanément aux échantillons d'intérêts. La relation entre la valeur de Ct obtenue et le logarithme de la concentration initiale du nombre de copie d'ADNc de la gamme étalon est une droite de type $y = ax + b$.

La pente (a) de cette droite permet de calculer l'efficacité de la PCR (E) selon la formule : $E = 10^{-1/\text{pente}-1}$. Si l'efficacité de PCR est de 100%, la valeur de Ct sera directement corrélée à la quantité d'ADNc initiale. Dans ce cas, lorsque le Ct augmente de 1 Ct entre deux points de dilutions successives de la gamme (dilution de $\frac{1}{2}$ en $\frac{1}{2}$), cela représente une cible initialement deux fois plus concentrée. Plus l'efficacité de la PCR diverge des 100%, plus l'interprétation des quantités relatives est difficile. L'efficacité de PCR est acceptée lorsqu'elle est comprise entre 90% et 105%.

II.7.5. Quantification relative des PCR en temps réel et analyses statistiques

La quantification des changements du niveau d'expression a été calculée en utilisant la méthode ΔC_t : c'est une variation de la méthode des $2^{-\Delta\Delta C_T}$ décrite par Livak (Livak and Schmittgen, 2001), l'actine étant utilisée comme témoin constitutif pour la normalisation, comme décrit dans le bulletin Bio-Rad Laboratories, Inc. Real Time PCR Applications Guide. C'est une approche simple basé sur la différence de la valeur de Ct entre le gène cible et notre gène de référence actine. Nous obtenons un rapport permettant de répondre aux questions : combien de fois le gène cible est-il plus ou moins fortement exprimé dans nos trois échantillons (feuille tige et racine) par rapport à une condition contrôle et au sein du même tissu, qu'elle gène *skp1* s'exprimant plus qu'un autre, toujours par rapport au gène de référence, l'actine.

La quantité du gène cible normalisé avec le gène de référence est alors donné par la formule suivante : $\text{Ratio (référence/cible)} = 2^{-(C_t \text{ référence} - C_t \text{ cible})}$

RESULTATS

RESULTATS

I. ETUDE PRELIMINAIRE DE L'EXPRESSION DE TROIS GENES SKP1, CULLIN1 ET RBX1 CHEZ LE BLE *TRITICUM AESTIVUM*

Le sujet de cette thèse s'inscrivait dans la phase initiale d'un nouveau projet portant sur la protéolyse ciblée chez le blé et que peu de travaux sont publiés sur les différents gènes codant pour les quatre sous-unités du complexe SCF, la première étape de ce travail a été le clonage de trois séquences codant pour Skp1, Cullin1 et Rbx1 et de voir l'expression de chaque gènes sous l'effet de différentes hormones. La stratégie adoptée consistait, dans un premier temps, en l'extraction de l'ARN total à partir de jeunes plantules de blé (âgées de 15 jours), suivie de la synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc) utilisant la technique de RT-PCR à l'aide d'amorces spécifiques synthétisées à partir de séquences disponibles dans les banques de gènes.

I.1. RT-PCR, clonage et séquençage

I.1.1. Le gène Skp1

La séquence ADNc Skp1 de blé a été obtenue sur la base de données GenBank (Annexe 3). C'est une séquence complète de 822 pb. Les différents couples d'amorces testés ont permis de cloner la séquence complète, ainsi que des séquences partielles de Skp1 (**Fig. 19**). La RT-PCR, a été réalisée sur des ARN totaux provenant de différents tissus du blé : racines, épis et feuilles.

Le couple d'amorce dessiné pour amplifier une séquence Skp1 de 404 pb a donné des amplifications avec la taille attendue. Les trois couples d'amorces créés pour amplifier des séquences Skp1 de 437, 584 et 810 pb ont donné des produits d'amplification de taille similaire, au niveau de 700 pb. Les produits d'amplification ont ensuite été purifiés et clonés dans le vecteur pGEMT-Easy pour être séquencés. Le séquençage a été réalisé en totalité pour les séquences partielles, et partiellement pour les séquences complètes (900 bases à partir de l'extrémité SP6 et 900 bases à partir de l'extrémité T7). Les séquences ont alors été comparées avec la séquence utilisée pour le dessin des amorces, par alignement de séquences

(Annexe 4). Nous avons pu observer l'existence d'une délétion de 60 paires de base dans les différents clones séquencés (Annexe 5).

La séquence nucléotidique est comparée dans les six cadres de lecture à l'aide du programme BLASTX. La comparaison est faite par rapport à la banque de données NCBI (National Center for Biotechnology Information). Nous n'avons trouvé aucune séquence publiée qui présente cette deletion. Il s'agirait donc d'un nouveau gène SKP1 blé que nous avons nommé TSK16. La séquence correspondant à la séquence TSK16 complète est convertie en séquence protéique, un codon d'initiation et un codon stop d'arrêt de traduction sont présents (Annexe 6).

I.1.2. Le gène Cullin1

La séquence ADNc complète de la protéine Cullin1 du blé, a été obtenue sur la base de données TIGR Wheat, il s'agit d'une séquence TC (tentative consensus) de 2610 pb (Annexe 7). Nous avons dessiné plusieurs couples d'amorces sur cette séquence TC. Trois couples sont destinés à amplifier partiellement la séquence, un couple est destiné à amplifier la séquence complète. Les séquences partielles de l'ADNc correspondant au gène Cullin1 ont été facilement amplifiées, clonées, puis entièrement séquencées. L'amplification sur ADNc est spécifique pour les trois couples d'amorces testés ; les trois bandes présentent les tailles attendues (354, 437 et 568 pb), nous pouvons donc supposer qu'il s'agit bien de séquences Cullin1.

La séquence TC complète de Cullin1 étant relativement longue, son clonage a nécessité un travail plus important de mise au point. Il a fallu synthétiser de nouveaux couples d'amorces spécifiques et ajuster les paramètres de PCR pour obtenir une amplification satisfaisante (**Fig. 20**). Les amplifications PCR sur ADNc présentent les tailles attendues pour les amorces 2512 pb et 2558 pb. Par contre, la bande attendue à 2554 pb se situe à 800 pb, il s'agit donc probablement d'une amplification non spécifique du gène Cullin1 ; ce qui s'est vérifié ensuite par séquençage.

L'analyse des séquences a permis de confirmer qu'il s'agit bien du gène Cullin1. Seul le couple d'amorces Cullin 2554 s'est avéré spécifique d'une autre protéine que Cullin1. Pour tous les autres couple d'amorces, les différents clones séquencés alignés sont identiques (Annexe 8).

Les deux fragments séquencés des séquences complètes de Cullin1 (extrémité SP6/T7) ont été convertis en séquences protéiques sur BioEdit, on constate la présence d'un codon d'initiation (ATG) et d'un codon stop (TAG), de traduction (Annexe 9). Ces clones sont donc potentiellement utilisables pour la production de protéines recombinantes fonctionnelles ou la production d'anticorps anti-peptides.

I.1.3. Le gène RBX1

Une séquence TC de Rbx1 a été obtenue sur TIGR Wheat. Une première série de couples d'amorces a été créé à partir de cette séquence. Ces amorces se sont avérées non pas spécifiques de Rbx1, mais d'un autre gène, correspondant à la protéine Ras-related protein RIC1 [*Oryza sativa*], (Annexe 10).

Nous avons créé de nouveaux couples d'amorces, à partir de trois contigs de Rbx, que nous avons créés grâce au logiciel CAP3 (Annexe 11). Les couples d'amorces spécifiques du Contig2 ont permis d'amplifier (**Fig. 21**) et de cloner une séquence Rbx1. Par alignement sur Clustalx, les clones sont tous identiques (Annexe 12).

Les amplifications de Rbx sur ADNc présentent les tailles attendues, à 492 et 630 pb. L'amplification à 630 pb est très faible, par rapport à celle de 492 pb.

I.1.4. Actine

La séquence ADNc du gène de l'actine a été obtenue sur TIGR Wheat et des amorces spécifiques de ce gène ont été créées avec le logiciel Primer3.

Le gène de l'actine a été facilement cloné et séquencé (Annexe 13). L'alignement des séquences a révélé des séquences homologues quel que soit l'organe de provenance des ADNc (racine, épis et feuille) (Annexe 14). Nous avons cloné des séquences partielles, nous n'avons pas cherché à amplifier l'ADNc complet de l'actine. Les amorces ont permis une amplification présentant la taille attendue (432 pb). On suppose donc qu'il s'agit bien du gène de l'actine.

Après analyse des données de séquençage, il s'est avéré que l'étape de caractérisation moléculaire nous a permis de créer des couples d'amorces fiables, permettant d'amplifier de manière spécifique, des séquences partielles des trois gènes d'intérêt (Cullin1, Skp1 et Rbx1) ainsi que d'un gène constitutif, l'actine. Nous avons retenu un couple d'amorces spécifiques

permettant d'amplifier la séquence ADNc partielle, pour chaque gène respectivement ; afin de réaliser les études d'expression par RT-PCR semi-quantitative, des 3 gènes d'intérêt, par rapport au gène de l'actine.

I.2. Etude de l'expression des trois gènes sous l'effet de différentes hormones

Les ARN totaux extraits des plantules présentent une qualité satisfaisante (**Fig. 22**) et les ratios calculés à partir des mesures de DO. Les résultats de dosages des ARN totaux sont présentés dans les tableaux en Annexe 15.

Sous les différents traitements hormonaux et la cinétique de prélèvement que nous avons effectués, l'expression des différentes sous-unités du complexe SCF que nous avons étudiées, ne varie pas. En effet, les bandes obtenues par migration sur gel des différents produits de PCR sont d'intensité constante au cours du temps et quel que soit le traitement hormonal (2,4D et GA₃) effectué, cela pour les trois sous-unités, TSK16, Cullin1 et Rbx1 ; relativement à celle de l'actine (**Fig. 23 à Fig. 28**).

I.2.1. Profils d'expression des gènes TSK16, Cullin1 et Rbx1

Nous avons mis en évidence la validation du choix de l'actine comme témoin constitutif dans nos conditions d'expérimentation. En effet, nous avons vérifié que l'expression du gène de l'actine est constante au cours du temps dans des plantules non traitées et dans des plantules traitées par pulvérisation d'eau. Le test par pulvérisation d'eau permet par ailleurs de confirmer que la méthode de traitement choisie n'influencera pas l'expression du témoin actine. Les **Figures 23 et 24** montrent une expression constante du gène TSK16 au cours de la cinétique de prélèvement, dans des plantules traitées par pulvérisation de 2,4D et de GA₃. De même les **Figures 25 et 26** montrent une expression constante du gène Cullin1 au cours de la cinétique de prélèvement dans des plantules traitées par pulvérisation de 2,4D et de GA₃. Enfin, les **Figures 27 et 28** montrent également une expression constante du gène Rbx1 au cours de la cinétique de prélèvement dans des plantules traitées par pulvérisation de 2,4D et de GA₃.

II. IDENTIFICATION DE DIFFERENTS GENES SKP1-LIKE CHEZ LE BLE *T. AESTIVUM*

II.1. Etude bioinformatique

Nous avons pu isoler dans la première partie de la thèse trois séquences complètes d'ADNc correspondant à un gène codant pour une protéine Skp1 et que nous avons noté TSK16, Cullin1 et Rbx1 dont uniquement une protéine SKP1 (TSK16). Cependant nous avons cherché à identifier d'autres gènes SKP1-like chez le blé pour pouvoir déterminer une étude fonctionnelle des différentes protéines SKP1 en cherchant les possibles interactions entre cette protéine et ces partenaires. Pour ce faire, l'équipe a commencé par collecter l'ensemble des séquences du complexe SCF chez le blé et a organisé ces dernières dans une base de données dédiée spécifiquement à ce complexe.

L'identification des gènes reste le souci premier de la phase d'annotation des gènes. La première étape consiste à importer des banques de données des séquences EST correspondant aux gènes SKP1-like chez le blé répertoriées dans les banques de données publiques. Les bases de données NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) et TIGR (Institute for Genomic research) (<http://www.tigr.org/db.shtml>) ont été utilisées. La validation des séquences ESTs a été effectuée par recherche d'homologies avec des protéines Skp1 de fonctions connues ou prédites répertoriées dans ces banques de données, en utilisant les programmes BlastN, BlastX et TBLastX. Ensuite les séquences ESTs recensées, ont été assemblées par le programme CAP3 dans le but d'obtenir des contigs potentiellement capable de coder des séquences complètes d'ADNc. Pour vérifier la présence de séquences complètes nous avons comparé avec une base de données locale contenant toutes les séquences Skp1 du riz. Enfin nous avons vérifié à l'aide du programme Interproscan, la présence dans ces protéines des motifs connus dans les séquences ESTs tels que le domaine SKP1 et le domaine POZ.

Les différentes séquences d'acides aminés du gène SKP1-like ont été alignées à l'aide du logiciel d'alignement ClustalX (BioEdit) pour noter les éventuelles homologies de séquences.

Afin de vérifier si ces différentes protéines peuvent former des complexes SCF, nous avons cherché à tester leur capacité à interagir avec des protéines F-box dans des levures. Pour ce faire, parallèlement aux gènes SKP1-like, nous avons cherché dans les banques de

données toutes les séquences F-box du blé *Triticum aestivum* de fonction prédites par comparaison avec les protéines F-box d'*Arabidopsis thaliana*. Au total nous avons retenu 5 gènes nommés ZTL-like (TC263895), TIR1-like (TA110180), ATfL5-like (TC251422), EBF-like (TA69163) et ABA-TUBBY-like (TC278982).

II.2. Nomenclature des gènes SKP1-like chez le blé *T. aestivum*

Suite à notre analyse bioinformatique, nous avons recensé un total de 20 séquences codant pour des gènes SKP1-like. Parmi lesquels nous avons 11 contigues et 9 singletons. Nous avons comparé ces gènes avec d'autres gènes SKP1 identifiés chez d'autres organismes et nous avons trouvé que 13 séquences SKP1 codent potentiellement pour des séquences complètes. De plus, les séquences SKP1 contiennent toutes les domaines fonctionnels SKP1 et POZ. Nous avons nommé une partie de ces gènes selon la nomenclature adoptée par Kong *et al.* (2007) : TSK1 (CK161460), TSK3 (AY316293), TSK4 (TC147337), TSK5 (TC147342), TSK6 (TC143188), TSK7 (TC153866), TSK10 (BQ245413), TSK11 (TC177247), TSK15 (TA50831_4565), TSK16, TSK17 (CA690194), TSK18 (TA52464_4565), TSK19 (TC236710) (Annexe 16 et 17). Le gène TSK16 est le gène SKP1 que nous avons identifié dans la première partie de notre travail et qui présente une délétion encore non caractérisée.

III. CLONAGE DES GENES TSKS, CULLIN1, F-BOX ET RBX1 CHEZ LE BLE *TRITICUM AESTIVUM* EN UTILISANT LA TECHNOLOGIE GATEWAY

La stratégie de clonage Multisite Gateway (Invitrogen) permet, à partir de deux vecteurs d'entrée codant respectivement pour un promoteur, un gène d'intérêt et une étiquette d'être recombinaées avec un vecteur de destination et ainsi créer une construction génique prête à être transfectée dans la levure (voir matériels et méthodes). Ainsi l'expression des protéines recombinantes des différentes sous-unités du complexe SCF du blé a été réalisée en utilisant la technologie GatewayTM. Les fragments sont alors amplifiés par PCR à partir d'ADNc de jeunes plantules de blé en utilisant un couple d'oligonucléotides spécifiques contenant des sites de clonage partiels pour le clonage de type Gateway attB1 (pour l'amorce sens) et attB2 (pour l'amorce reverse) (voir matériels et méthodes). Parmi les 13 séquences TSKs, nous avons malheureusement pas réussi, à amplifier les gènes TSK5, TSK7 et TSK10. Les

amplicons obtenues, ont été par la suite cloné dans un vecteur d'entrée pDonor221. Cependant nous n'avons pas réussi à cloner TSK4, TSK18 et TSK19 avec cette approche. Au total 7 gènes TSKs, 5 gènes F-box, un gène Cullin1 et un gène Rbx1, ont été obtenus chacun dans un clone d'entrée «pDONOR221» et dans deux clones d'expression «pDEST22» et «pDEST32». Les différents modes de sélection sur boîtes de Petri nous ont permis de sélectionner à chaque étape de clonage, 3 clones positifs par gène. Ces résultats ont été confirmés par séquençage.

IV. RECHERCHE DE PARTENAIRES FONCTIONNELS POUR LES DIFFERENTES PROTEINES TSKS CHEZ LE BLE

Dans cette analyse protéomique, l'enjeu est de déterminer les éventuelles interactions physiques entre les différentes protéines (Rbx, Cullin, Skp1 et F-box) du complexe multiprotéiques SCF. L'approche utilisée est celle du double-hybride dans la levure.

IV.1. Vérification de l'expression des différentes protéines de fusion TSKs-DBDGAL4

Les gènes TSKs clonés dans le pDEST32 codent, pour des protéines recombinantes contenant la séquence d'intérêt fusionnée à l'étiquette GAL4-BD. Pour vérifier ce résultat nous avons décidé de réaliser un western-blot en utilisant les anticorps monoclonaux dirigés contre l'étiquette GAL4-BD. La souche MaV203 a été utilisée lors de cette étude. Les cellules contenant les constructions géniques sont mises en croissance à 30°C toute une nuit. Après une mesure de la DO, la culture a été diluée avec du milieu YPAD pour obtenir une $DO_{595} = 0.5$ afin de relancer la croissance des cellules pendant 5h. Au cours de la culture, des échantillons ont été prélevés en phase exponentielle et stationnaire de croissance, puis centrifugés et extraits comme décrits dans la partie Matériels et Méthodes.

Les extraits cellulaires des souches de levure ont été préparés et analysés sur un gel dénaturant à 10% de polyacrylamide (**Fig. 29**). Ce dernier a été transféré sur membrane de nitrocellulose et révélé par immuno-détection à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-GAL4-BD et d'anticorps secondaires de souris HRP, couplés à une activité peroxydase. Nous avons pu observer l'expression des protéines de fusion TSKs entre 25 et 37 kDa (**Fig. 30**). Cependant, aucune bande n'a été détectée dans les deux souches de levure portant les

protéines TSK15 et TSK17. Malgré cette absence d'activité, les constructions TSK15 et TSK17 ont été testées dans l'espoir de découvrir des partenaires physiologiques. En effet, ces protéines de fusion peuvent faire l'objet d'interactions avec d'éventuels partenaires et l'absence d'activité de fixation au motif GAL4-BD n'est pas un critère suffisant pour ne pas poursuivre cette étude. Cette absence d'activité peut être due à un encombrement stérique.

IV.2. Les protéines TSKs sont elles équivalentes ?

Il n'existe aucune information sur la fonction des gènes TSKs chez le blé. Pourtant, l'un des motifs conservé des protéines SKP1 consiste en un motif POZ capable de lier les sous-unités du complexe SCF. Ce domaine POZ a été trouvé dans toutes les protéines TSKs identifiées. Ainsi une protéine TSK pourrait-elle interagir avec une ou plusieurs protéines F-box et/ou Cullin ? Pour répondre à cette question et vérifier si oui ou non une protéine TSK fait partie d'un complexe protéique SCF, nous avons réalisé une étude en utilisant la technique du double-hybride dans la levure. L'interaction entre les différents couples protéiques a été faite dans les deux sens. Dans un premier test, les gènes codant pour des TSKs ont été utilisés comme un appât après fusion des différents gènes TSKs au domaine de liaison à l'ADN de GAL4. Les gènes F-box et Cullin, construits par fusion au domaine d'activation de la transcription du gène GAL4 dans le bon cadre de lecture ont été utilisés comme proie. La souche de levure utilisée pour réaliser les expériences de double-hybride est MaV203. Sur ses trois gènes rapporteurs possédant dans leur promoteur le motif de séquence qui lie le facteur de transcription GAL4, un gène rapporteur *lacZ* va donc, s'il est exprimé, permettre de quantifier la force de l'interaction. La souche MaV203 a été transformée en même temps par le plasmide pDEST32 (qui exprime la protéine appât fusionnée avec le domaine de fixation à l'ADN de la protéine Gal4) et le plasmide pDEST22 (qui exprime la protéine proie possédant le domaine d'activation de transcription de GAL4). Les cellules co-transformées sont mises en croissance sur milieu sélectif pour une vérification phénotypique. Ce crible nous a permis d'identifier plus de 100 clones montrant une croissance efficace sur un milieu sélectif.

Pour s'assurer de la non toxicité de la protéine de fusion étudiée. Nous avons analysé la capacité de la souche de levure transformée par le plasmide codant pour toutes les constructions à se développer sur le milieu sélectif.

Nous avons également vérifié que, seules, toutes les protéines étudiées (en appât ou proie) n'activent pas la transcription même en l'absence d'interacteur. Ce contrôle s'effectue

par l'analyse du gène rapporteur lacZ dans la souche de levure n'exprimant que l'appât ou la proie fusionnés.

IV.2.1. La protéine TSK1

Les souches de levure transformées par un seul plasmide, se développent sur milieu sélectif Sc-leu-trp (voir matériels et méthodes) et ne présentent pas de couleur bleue lors du test X-Gal, démontrant que la construction n'est pas toxique et qu'elle n'active pas d'elle-même la transcription de la β -galactosidase. Nous observons (**Fig. 31**), que la protéine TSK1, présente des interactions avec les protéines F-box : ZTL et ABA-TUBBY dans le sens TSK1, appât et les protéines F-box, proies. L'interaction réciproque n'a pas été obtenue. Nous avons noté également une forte interaction entre la protéine TSK1 et la protéine ATFB15. En effet la coloration bleue est apparue après 20 minutes d'incubation dans la solution Z (voir matériels et méthodes). De plus l'interaction entre ce couple de protéines s'est faite dans les deux sens (TSK1proie/ATFB15appât et TSK1appât/ATFB15proie). Par contre, malgré une efficacité de transformation de la souche de levure par les couples TSK1/TIR1 et TSK1/Cullin1 sur milieu sélectif, aucune colonie bleue n'a été détectée lors du test X-GAL, même après 48 heures d'incubation. Cette étape de transformation a été renouvelée et malgré une efficacité de transformation similaire, celle-ci conduit au même résultat, à savoir l'absence de colonie bleue caractéristique de la dégradation du X-Gal par la β -galactosidase. Ainsi les protéines TIR1 ou Cullin1 ne semblent pas interagir avec la protéine TSK1.

IV.2.2. La protéine TSK3

Les plasmides pDEST22 et pDEST32, dont les constructions sont décrites dans la **Figure 32**, ont été utilisés pour transformer la souche de levure *Saccharomyces cerevisiae*. Les cellules de MaV203 obtenues se développent sur le milieu sélectif et ne présente aucune coloration bleue lors du dosage X-Gal, démontrant que la construction n'est pas toxique et que, seule, elle n'active pas la transcription du gène rapporteur lacZ. La protéine TSK3, comme la protéine TSK1, interagit avec la protéine ZTL uniquement dans le sens TSK3, appât et ZTL, proie. Egalement, l'interaction entre TSK3 et ATFB15 semble forte, la coloration bleue est apparue au bout d'une demi-heure, et se fait dans les deux sens. Cependant, Malgré une efficacité de transformation, la protéine TSK3 semble incapable de fixer *in vivo* les protéines F-box, ABA-TUBBY et TIR1 ni la protéine Cullin1 (**Fig. 32**).

IV.2.3. La protéine TSK6

Concernant la protéine TSK6, nous avons de la même manière vérifié que les constructions ne sont pas toxiques et qu'elles n'activent pas seules la transcription de la β -galactosidase. Cependant aucune colonie bleue n'a été détectée suite au test X-gal ni dans un sens ni dans l'autre, même après 3 jours d'incubation (**Fig. 33**).

Cette étape de transformation a été renouvelée et malgré une efficacité de transformation similaire, celle-ci conduit au même résultat. Ainsi aucun partenaire n'a pu être mis en évidence pour la protéine TSK6.

IV.2.4. La protéine TSK11

De façon intrigante, nous avons détecté une autoactivation chez la protéine TSK11 dans le système du double-hybride. Cependant nous avons remarqué (**Fig. 34**) que la protéine TSK11 interagit uniquement dans le sens qui met cette protéine dans la position de la proie. Cependant la propriété d'autoactivation ne permet pas d'affirmer avec certitude les capacités réelles d'interaction entre les différentes protéines.

IV.2.5. La protéine TSK16

Comme la protéine TSK6, nous n'avons obtenu aucune interaction positive pour la protéine TSK16. Malgré une bonne efficacité de transformation. Ainsi, nous n'avons identifié dans cette étude aucun partenaire cloné de la protéine TSK16 (**Fig. 35**).

Concernant les protéines TSK15 et TSK17, qui ne présentaient aucun signal lors de l'analyse par western-blot, nous avons supposé comme expliqué plus haut que l'absence de signal peut être due à un encombrement stérique. Nous avons alors cherché les différents partenaires potentiels comme pour les autres protéines TSKs. Cependant nous n'avons détecté aucune interaction possible.

De même, nous avons cherché à identifier une possible interaction entre la protéine Cullin1 et la protéine Rbx1 clonées dans le laboratoire. Nous avons fait exprimer dans le système du double-hybride les deux constructions (pDEST22(Cullin1)/pDEST32(Rbx1))

pDEST32(Cullin1)/ pDEST22(Rbx1)). Malheureusement les souches MaV203 obtenues ne se développent pas sur le milieu sélectif et la protéine de fusion Rbx1 semble toxique pour la levure.

Nous avons résumé dans **Tableau 6**, l'essentiel des résultats des interactions observées en double-hybride en précisant à chaque fois le domaine connu contenu dans les différentes protéines F-box. A savoir le domaine PAS représenté par la protéine ZTL, le domaine LRR représenté par les protéines ATFBLL5, EBF et TIR1 et enfin le domaine Tubby représenté par la protéine ABA-TUBBY. Nous avons recherché ces motifs à l'aide du programme Interproscan.

V. ETUDE STRUCTURE/FONCTION DE LA PROTEINE TSK11

Parmi les protéines TSK étudiées, TSK11 semble présenter des propriétés structurales et fonctionnelles particulières par comparaison avec les autres protéines TSKs. C'est pour ces raisons que nous avons décidé de plus focaliser nos travaux sur cette protéine.

La séquence en acides aminés correspondant au gène TSK11 a été alignée avec 12 autres séquences TSKs, isolés aux cours de notre étude, ainsi que la protéine SKP1 humaine (Hs-SKP1) et SKP1 d'*Arabidopsis* (ASK1) (**Fig. 36**). Par comparaison de séquences, nous avons remarqué que plusieurs acides aminés sont conservés au sein d'une même espèce et entre les espèces végétales et animales (**Tableau 7**). Le domaine POZ, fortement conservée d'une espèce à l'autre, a été détecté dans toutes les séquences TSKs. Cependant, nous avons noté la présence de trois régions supplémentaires qui sont moins conservées. La première région correspond à la partie centrale des protéines SKP1-Like entre les positions 100 et 140 dans le cas de la protéine TSK11. Cette région polymorphe, se caractérise par différentes longueurs en fonction de la protéine. La deuxième région se situe au niveau de l'extrémité C-terminale et se caractérise par des différences au niveau de plusieurs acides aminés. Quant à la troisième région, elle se caractérise par une insertion d'une trentaine d'acides aminés à l'extrémité N-terminal de la protéine TSK11. Ce domaine n'existe pas dans les autres protéines TSKs.

Nous avons donc entrepris d'analyser certains de ces domaines en utilisant des formes tronquées ou chimériques de la protéine TSK11. Dans un premier temps, nous avons éliminé

le domaine qui se trouve en amont du domaine POZ mis en évidence grâce au logiciel Interproscan. Nous espérons en découpant TSK11 pouvoir mieux comprendre la nature de l'interaction de la protéine TSK11 avec ses partenaires et plus précisément vérifier si ce nouveau domaine intervient physiquement dans l'interaction.

V.1. L'interaction et/ou l'autoactivation entre TSK11 délétée de son domaine en N-terminal et ces différents partenaires est abolie

Nous avons réalisé une délétion en respectant le cadre de lecture de la protéine TSK11 pour obtenir une séquence TSK11 tronquée à laquelle nous avons ajouté un codon ATG d'initiation de la traduction (**Fig. 37**). Ensuite nous avons redessiné un nouveau couple d'amorces spécifiques contenant les sites de clonage Gateway attB1 et attB2 et nous avons amplifié par PCR le gène codant la forme tronquée de la protéine à partir d'ADN plasmidique. Ce fragment délété ainsi que la protéine TSK11 entière ont été clonés, chacun et dans les mêmes conditions, dans des plasmides de double-hybride avec le domaine de fixation à l'ADN de Gal4 et le domaine d'activation de la transcription par Gal4.

Nous avons transformé la souche de levure MaV203 par une paire de plasmides. Ces paires comportent chacune un plasmide pDEST32/ pDEST22 contenant le gène TSK11 entier ou tronqué et un des gènes dont les produits ont été identifiés comme des partenaires de TSK11 par la méthode de double-hybride (ZTL, TIR1, ATFbL5, EBF, ABA-TUBBY et Cullin1). Nous avons étudié l'interaction entre 2 protéines fusions en suivant l'expression du gène rapporteur LacZ de la souche hôte, et deux expériences indépendantes ont été réalisées.

La **Figure 38** montre les résultats pour chaque interaction. Nous observons que la protéine TSK11 tronquée perd sa capacité d'interaction avec tous ces partenaires. Ce résultat montre que ce nouveau domaine est vraisemblablement requis dans l'efficacité de l'interaction de TSK11 avec ses différents intérateurs identifiés dans cette étude.

En parallèle, nous avons vérifié par western-blot que la protéine TSK11 tronquée est exprimée dans la levure et que le fait de lui enlever un fragment n'altère en rien l'expression du gène dès lors que le cadre de lecture est respecté.

A l'issue de ce résultat fort intéressant nous avons voulu pousser notre étude et voir si en ajoutant ce nouveau domaine à une protéine TSK n'ayant manifesté aucune affinité ni aux

protéines F-box ni à la protéine Cullin1, serait-elle capable d'acquérir une nouvelle fonction. Pour se faire nous avons choisi la protéine TSK6.

V.2. L'interaction entre la protéine chimère N-domain-TSK6 et les protéines ZTL et ATFB15 est instaurée

Pour comprendre donc le rôle du nouveau domaine, nous avons construit une protéine chimère TSK6 à laquelle nous avons ajouté par synthèse de gène (Proteogenix SA, France), 29 acides aminés dans son extrémité N-terminale (**Fig. 37**). Le cadre de lecture étant respecté.

L'ADN a été ensuite amplifié à l'aide d'amorces spécifiques et cloné dans les plasmides adéquats. Nous avons généré les vecteurs appâts et proies contenant la séquence codant pour la protéine TSK6 complète et chimère. Ces deux dernières constructions devaient nous permettre d'étudier ultérieurement si la partie insérée intervient dans l'interaction avec d'éventuels partenaires. Nous avons transformé la souche de levure MaV203 et sélectionné les clones de levures pouvant pousser sur le milieu sélectif. Les constructions que nous utilisons ne doivent pas elles-mêmes activer les gènes rapporteurs. Nous avons donc contrôlé que les levures transformées ne donnent pas de coloration bleue aux tests X-gal.

Nous observons (**Fig. 39**) que la protéine TSK6 chimère montre une forte interaction avec les deux protéines F-box (ZTL et ATFB15). Cette interaction est donc attribuée au nouveau domaine inséré au niveau de l'extrémité N-terminale de la protéine TSK6. Aucune interaction n'a été observée pour les autres couples. Cette expérience a été réalisée deux fois et a conduit au même résultat.

Concernant les souches de levures transformées respectivement par les couples de plasmides pDEST32(Cullin1)/pDEST22(TSK11-T) et pDEST32(Cullin1)/pDEST22(TSK6-C), nous n'avons pas réussi l'étape de la co-transformation.

V.3. TSK11 forme-il un homodimère ?

La présence du domaine d'homodimérisation a été vérifié par analyse bioinformatique (Interproscan). Cependant, pour vérifier si la protéine TSK11 possède les propriétés communes d'homodimérisation des protéines SKP1-Like, nous avons réalisé un criblage double-hybride pour la protéine TSK11 complète et tronquée.

Nous avons remarqué une interaction positive pour les souches de levure transformées par le couple AD-TSK11 et BD-TSK11, ce qui indique que nous avons bien une

homodimérisation (**Fig. 40a**). Cependant la protéine tronquée a perdu sa flexibilité et devient incapable de former un homodimère (**Fig. 40b**).

VI. EXPRESSION DES GENES TSKS CHEZ LE BLE

Pour cette étude, nous avons analysé l'expression des cinq gènes TSKs du blé identifiés par la méthode du double-hybride, dans trois tissus différents (feuille, tige et racine). Les analyses par RT-PCR (**Fig. 41**), ont mis en évidence une expression constitutive des gènes TSK3, TSK6 et TSK11. Tandis que les gènes TSK1 et TSK16 sont exprimés préférentiellement dans les racines.

Parallèlement, nous avons analysé l'expression des gènes TSKs au cours de différents stades de développement à savoir 3 Feuilles (F), 3 Talles (T), Epi 1cm (E), 2Noueds(N), Méiose (M) et Floraison (F). Nous avons effectué une RT-PCR à l'aide d'amorces spécifiques (**Tableau 6**) et nous avons utilisé la tubuline (Tub) comme gène de référence. Seul le gène TSK11 a montré un profil d'expression variable au cours du développement du blé. Les résultats montrent (**Fig. 42a**), que le transcrit du gène *TSK11* est détecté à tous les stades analysés et que la quantité de transcrit augmente à la floraison. Pour valider ces résultats, nous avons choisi d'utiliser la RT-PCR quantitative qui a l'avantage d'être sensible, spécifique et rapide. Nous avons utilisé également des échantillons de feuille à différents stades de développement et le gène tubuline (Tub) comme contrôle d'expression constitutive. L'analyse (**Fig. 42b**), confirme la surexpression du gène TSK11 au moment de la floraison.

DISCUSSION

DISCUSSION

L'étude de la fonction d'une protéine implique souvent de connaître les partenaires d'interaction afin d'obtenir des indications sur la (les) fonction(s) de cette protéine. Le but de ce projet de recherche était de vérifier l'interaction entre la sous-unité Skp1 et ses différents partenaires du complexe SCF. Ce complexe multimérique représente l'une des classes les plus fréquentes d'ubiquitine ligase E3 et il est composé de quatre sous-unités (RBX, Cullin, Skp1, et F-box). La sous-unité Skp1 a un rôle d'adaptateur entre l'ensemble Cullin1-Rbx1, sous-unité catalytique du complexe SCF, et la protéine F-box, responsable de la reconnaissance spécifique du substrat (Bai et al, 1996 ; Skowyra et al, 1997). Plusieurs études suggèrent que l'existence de différents gènes codant pour les protéines Skp1, impliquerait différentes fonctions. Une caractérisation moléculaire et biochimique de la sous-unité SKP1 a été donc initiée chez le blé hexaploïde.

I. LA FAMILLE SKP1 CHEZ LE BLE *TRITICUM AESTIVUM*

L'analyse bioinformatique nous a permis de recenser un total de 20 séquences codant pour des protéines SKP1-like chez le blé. Cette famille multigénique est représentée par 21 gènes chez *Arabidopsis thaliana*, 32 chez *Oryza sativa*, 36 chez *Medicago truncatula* et 31 chez *Zea mays* (Kong et al, 2007 ; Zhou et al, 2010). D'après ces données, il est fort probable que le nombre de 20 séquences recensées chez le blé ne reflète pas le véritable nombre de gènes SKP1 contenus dans le génome du blé hexaploïde et qui devrait être proche de la trentaine. Le nombre limité de gène SKP1-like chez le blé, représentés dans les bases de données, est probablement dû aux différents niveaux d'expression entre les gènes. Certains de ces gènes s'expriment faiblement et dans des organes qui ont peu servi à fabriquer les banques cDNA qui sont la ressource utilisée pour générer des EST issues du blé. Cependant, une étude antérieure a montré que parmi les 20 séquences nucléotidiques du blé, 13 codent, potentiellement, pour des protéines SKP1 complètes (Kong et al, 2007). L'analyse phylogénétique des gènes SKP1-like de différentes espèces (*Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Populus trichocarpa*, *Brassica napus*, *Zea mays* et *Triticum aestivum*), a montré que cette famille de gène a évolué très récemment à partir d'un gène ancestral commun (Kong et al, 2007).

Différentes études, ont montré que l'expression des gènes SKP1 varie dans les différents organes et à différent stade de développement. Chez *Arabidopsis thaliana*, ASK1, 2, 20 et 21 s'expriment dans la totalité des tissus étudiés tandis que ASK5 s'exprime uniquement dans les inflorescences (Naoki et al, 2004 ; Dazhong et al, 2003). Cependant, pour notre étude, nous avons isolé des gènes TSKs à partir de plantules de blé âgées de 2 à 3 semaines et malheureusement, nous n'avons pas réussi à amplifier la totalité des gènes SKP1 du blé. Au total, sept gènes TSKs ont été isolés, clonés et analysé par la technique du double hybride.

II. RECHERCHE DE PARTENAIRES FONCTIONNELS

Au départ de ce travail, rien n'était connu de la fonction des gènes TSKs chez le blé. Comme ils possédaient des motifs connus pour être des motifs d'interaction protéiques (les domaines SKP1_POZ et SKP1), nous nous sommes proposé de réaliser un criblage double-hybride pour rechercher des partenaires potentiels de ces protéines. Pour se faire, un western-blot a été réalisé, en utilisant les anticorps anti-BD. Cette expérience a révélé la présence de protéines de fusion pour les gènes TSK1, TSK3, TSK6, TSK11 et TSK16. Uniquement, deux protéines, TSK1 et TSK3, étaient capable d'interagir spécifiquement avec les protéines F-box testées et une protéine TSK11, a révélé la propriété d'autoactivation qui gêne les interactions entre les différents partenaires. Ce résultat intéressant, suggère que le complexe TSK/F-box existe chez le blé et se caractérise par la spécificité au substrat. Plusieurs interactions ont été mises en évidence par le système double hybride : chez *Arabidopsis thaliana*, 10 protéines ASKs, sur 12 étudiées, interagissent avec des protéines F-box. En particulier, les protéines ASKs fixe des familles de protéines F-box groupés en fonction de leurs domaines F-box (Takahashi et al, 2004). Chez le riz, Sasaki et ses collaborateurs (Sasaki et al, 2003) ont montré grâce à des cribles en double-hybride, que la protéine OsSkp2 représentait une forte interaction avec la protéine F-box du riz, GID2 alors que la protéine OsSkp5 n'interagissait pas avec la F-box. Cependant il a été suggéré par Gomi (Gomi et al, 2004) qu'OsSkp2 n'est pas le partenaire réel de la protéine GID2 et que la protéine OsSkp15 représente une forte affinité pour la protéine F-box. D'autres expériences menées par Escusa (Escusa et al, 2007) ont montré que la protéine Skp1p de la levure interagit avec la protéine F-box Sfp1p en double hybride, sachant que parmi 21 protéines F-box de levure très peu d'entre elles

participent à des complexe SCF (Galan et al, 2001 ; Kaplan et al, 1997 ; Escobar-Henriques et al, 2006).

A côté de l'interaction TSKs-Fbox que nous avons caractérisé et dont le rôle biologique reste à préciser, on s'est aussi interrogé sur celles entre TSKs-cullin1 et cullin1-Rbx1. En effet pour faire partie d'un complexe SCF, une protéine TSKs doit fixer à la fois une protéine F-box et le complexe Cullin1-Rbx1, pour avoir une activité E3 ligase. Malheureusement aucune protéine TSKs en particulier TSK1 et TSK3 n'interagit avec la protéine Cullin1. Deux hypothèses pourraient expliquer ce résultat. La première hypothèse est que les protéines TSK1 et TSK3 forment des complexes SCF avec d'autres protéines cullin1, non identifié dans ce travail. Cette hypothèse serait supportée par différentes équipes qui ont réussi à caractériser l'interaction entre les protéines Skp1 et Cullin1. Chez l'Homme, le nématode (*C. elegans*) et la levure (*S. pombe*), la protéine Skp1 interagit exclusivement avec la CullinI (Furukawa et al, 2002 ; Kominami et al, 1998 ; Nayak et al, 2002 ; Yamanaka et al, 2002) alors que les protéines Cullin II, III, IV et V fixent d'autre protéines adaptateurs. Le génome d'*A. thaliana* compte 5 protéines Cullin fonctionnelles (Cullin1, Cullin2, Cullin 3A, Cullin3B et Cullin4) ; la protéine AtCullin1 et AtCullin2 forment un complexe SCF avec ASK1 et ASK2 (Risseuw et al, 2003).

Il est en revanche probable, que les protéines TSK1 et TSK3 forme plutôt un complexe NON-SCF. En effet, chez la levure, la protéine SKP1 interagit avec la protéine F-box, RCY1, pour former un complexe binaire. Ce dernier est impliqué dans le recyclage de la protéine SNC1 nécessaire à la fusion de vésicules de Golgi à la membrane plasmique (Galan et al, 2001). De même la protéine SKP1 forme avec la protéine F-box, MFB1 un complexe non-SCF responsable de la morphologie et l'évolution des mitochondries (Kondo-Okamoto et al, 2006).

L'étude de Takahashi (Takahashi et al, 2004), a montré que les protéines ASK10 et ASK17 n'interagissent avec aucune des 16 protéines F-box caractérisées chez *A. thaliana*. Notre étude a révélé que les protéines TSK6 et TSK16 ne fixe ni les protéines F-box ni la protéine Cullin1. Cependant, au cours de ce travail, le nombre de protéine F-box disponible dans les bases de données était limité et les protéines de fusion TSK6 et TSK16, étant totalement synthétisée, peuvent faire l'objet d'interactions avec d'autres protéines F-box. Cette hypothèse est appuyé par le fait que les protéines TSK6 et TSK16 présente dans leurs séquences d'acides aminés 4 domaines protéiques à hélice α (H5, H6, H7 et H8) (**Fig. 36**) très conservés et impliqué dans l'interaction de Skp1 humaine avec la protéine F-box, Skp2

(Risseuw et al, 2003). Ce constat, suggère la possibilité de leur interaction avec d'autres protéines F-box qui n'ont pas été étudiées. Ainsi l'absence d'interaction n'est pas un critère suffisant pour dire qu'une protéine TSKs ne fait pas partie d'un complexe multi-protéique.

Chez l'homme, la cristallographie par rayon X des protéines RBX1, Cullin1, Skp1, et F-box (Skp2), a été étudiée pour mieux comprendre les mécanismes d'action et les liaisons entre ces différentes sous unités. Ces études ont identifié 26 acides aminés jouant un rôle clé dans l'interaction entre cullin1-Rbx1 et Skp1-Fbox (Zheng et al, 2002 ; Schulman et al, 2000).

D'autres analyses menées par Kong (Kong et al, 2004) sur l'évolution des groupes de gènes SKP1 de différentes espèces animales et végétales sur une échelle de temps, ont montré que certains gènes étaient lents ou rapides en évolution tandis que d'autres étaient modérés. En effet chez *C. elegans*, *D. melanogaster*, *A. thaliana* et *O. sativa*, les gènes Skr-1, Dm. SkpA, Ask1, Ask2, Ask4 et Osk1 ont évolué plus ou moins lentement ; tandis que les gènes Skr6-21, Dm.CG15800 et Osk2-24 ont évolué significativement plus rapidement dans le temps. Cependant les gènes Skp1-like des espèces fongiques ont évolué de façon modérée.

Ces auteurs ont constaté que les gènes qui ont évolué plus lentement dans le temps ont conservé les positions de leurs acides aminés, impliqués dans l'interaction entre les différentes protéines du complexe SCF. Tandis que l'évolution rapide a conduit à l'élimination de séquences et par conséquent d'acide aminés. Ils ont donc suggéré que la perte de capacité d'interagir avec les protéines Cullin1 et F-box peut être le résultat d'une divergence des génomes à l'échelle de temps par accumulation des mutations (Kong et al, 2004).

Au cours de notre étude, nous avons comparé les séquences d'acides aminés des 7 gènes TSKs du blé avec la protéine SKP1 humaine et d'autres protéines Skp1 appartenant à différentes espèces (**Tableau 7**). Nous avons remarqué que les 26 acides aminés sont conservés partiellement ou totalement chez le blé. Ainsi nos résultats seraient en faveur d'une évolution lente des gènes TSKs en particulier les gènes TSK1 et TSK3 qui présente la totalité de ces acides aminés dans leurs différentes positions.

III. Etude structure-fonction de la protéine TSK11

L'étude des interactions concernant TSK11 a été gênée par la propriété autoactivatrice de cette protéine. Cependant l'interaction de TSK11 avec les différentes protéines F-box et la protéine Cullin1, reste possible.

L'alignement de séquences des différentes protéines TSKs (**Fig. 36**) a révélé la présence d'un nouveau domaine, représenté par 29 acides aminés, sur la protéine TSK11. Il est donc probable que cette structure atypique de TSK11 soit un avantage lui permettant de se lier avec un grand nombre de cibles. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons entrepris d'enlever ces acides aminés tout en vérifiant la position des différents domaines qui constituent la protéine TSK11, afin de ne pas supprimer les domaines importants (SKP1_POZ et SKP1) impliquées fonctionnellement dans l'interaction. Nous espérons en "découpant" TSK11 pouvoir mieux comprendre la nature de l'interaction de cette protéine avec ses partenaires et plus particulièrement avec les protéines F-box et cullin1 identifiées au préalable par la méthode double-hybride.

Néanmoins, en utilisant la forme tronquée de TSK11 il n'a pas été possible de détecter une interaction et la protéine mutée a perdu sa propriété d'auto-activation. Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que TSK11 contient uniquement 16 des 26 acides aminés essentiels conservés dans la famille des gènes SKP1 (**Tableau 7**). Cependant, TSK11 pourrait interagir avec d'autres protéines F-box et cullin1 qui n'ont pas été identifiées dans cette étude.

Une autre hypothèse découlant de ce résultat serait que ce nouveau domaine pourrait jouer un rôle dans la capacité d'interaction de la protéine TSK11 avec ces partenaires. Pour vérifier ce résultat nous avons fusionné en N-Ter ces 29 acides aminés à la protéine TSK6 qui n'a interagit avec aucune des protéines du complexe SCF étudiées. Le criblage en double-hybride a montré que cette protéine chimérique a acquis une nouvelle capacité d'interagir avec deux protéines F-box (**Fig. 39**). Ce résultat intéressant indiquerait que ces 29 acides aminés participeraient aussi à l'établissement d'interactions entre SKP1 (TSK11) et des protéines F-box. Il est aussi probable qu'en plus des 26 acides aminés cruciaux, la structure 3D de la protéine globale contribue de manière significative à l'établissement de ces interactions.

Des études ont montré que la protéine SKP1 se caractérise par une extrémité N-terminal variable et deux domaines (SKP1_POZ et SKP1) fortement conservés, séparés par une région variable (Schulman et al, 2000). Le domaine SKP1_POZ est impliqué dans l'interaction SKP1-Cullin1 (Schulman et al, 2000 ; Zheng et al, 2002), alors que le domaine SKP1 est important pour l'interaction avec les protéines F-box. Cependant lors de ce travail nous avons montré qu'en plus de ces deux domaines conservés, il existe des domaines supplémentaires, 29 acides aminés pour la protéine TSK11, impliqués directement dans l'interaction des protéines SKP1 avec les protéines F-box. Un alignement de séquences (**Fig. 36**) de 87 protéines SKP1 de différents organismes, a révélé que les séquences d'acides

aminés des protéines OSK2 et OSK7 du riz et la protéine Sb01g02116 du sorgho, ressemblent étroitement à la protéine TSK11. En effet, elles présentent à leur extrémité N-terminal des « extensions » supplémentaires en amont du domaine SKP1_POZ ; Cependant aucune de ces régions supplémentaires n'était semblable à l'extrémité N-terminale de la protéine TSK11 du blé.

IV. L'expression relative des gènes du complexe SCF chez le blé

Comme nous l'avons indiqué précédemment, chez les plantes, Les différents gènes SKP1-like se caractérisent par différents profils et niveaux d'expression. En particulier *Arabidopsis thaliana* chez qui l'expression des gènes ASKs a été beaucoup étudiée et il a été montré que les gènes codant les protéines de chaque groupe (en fonction de la similitude de séquences) ont le même profil d'expression et une fonction redondante. En effet ASK1 s'expriment d'une façon constitutive dans les différents tissus testés, alors que Les gènes ASK3 et ASK4 sont exprimés uniquement dans la silique et l'inflorescence. Les gènes ASK7, ASK8 et ASK10 quant à eux s'expriment préférentiellement dans la silique. Enfin les gènes ASK11 et ASK12 sont abondants dans l'inflorescence. L'expression similaire des gènes ASKs appartenant à un même groupe suggère une évolution récente dans le temps. Cependant d'autre gènes, ASK5, ASK13, ASK14, ASK15, ont montré une divergence structurale et fonctionnelle (Marrocco et al, 2003 ; Zhao et al, 2003b ; Takahashi et al, 2004).

Dans notre travail, nous avons comparé le profil d'expression de 5 gènes TSKs. Les analyses de RT-PCR, ont mis en évidence une expression constitutive des gènes TSK3, TSK6 et TSK11. Tandis que les gènes TSK1 et TSK16 sont exprimés préférentiellement dans les racines. Compte tenu du nombre très limité des gènes TSKs étudiés, nous nous ne sommes pas en mesure de tirer des conclusions concernant les fonctions des gènes TSKs chez le blé. Cependant, on peut émettre l'hypothèse d'une éventuelle équivalence fonctionnelle entre TSK3 et ASK1/ASK2, vu leurs expression constitutive dans différents tissus ainsi que leurs interactions avec certains partenaires du complexe SCF.

Au cours du développement du blé, les transcrits TSK11, faiblement présents dès le premier stade de développement, s'accumulent progressivement avec un maximum au stade floraison. Ce résultat suggère une implication du gène TSK11 dans la régulation de la

floraison. Des analyses génétiques utilisant des mutants *Arabidopsis* ont montré que la voie ubiquitine-protéasome 26S est impliqué dans le développement de la fleur (Yang et al, 1999 ; Zhao et al, 1999 ; Zhao et al, 2001, 2003b). Particulièrement la protéine ASK1 régule la fonction des gènes de classe B du modèle « ABC », dans la formation des différentes parties de la fleur d'*Arabidopsis thaliana* (Ni et al, 2004). Il est donc possible que la protéine TSK11 forme un ou plusieurs complexes SCF spécifiquement impliqués lors de la floraison chez le blé. Cette hypothèse mériterait d'être vérifiée par transgénèse. Malheureusement, si cette technologie existe et est maîtrisée dans notre UMR, elle est cependant longue et fastidieuse et ne pourrait être utilisée actuellement pour des études aussi académiques.

Enfin, les trois sous-unités Cullin1, TSK16 et Rbx1 s'expriment de manière constante au cours de la cinétique de prélèvement, quel que soit le traitement réalisé. Ces résultats impliquent que l'expression des sous-unités du complexe SCF étudiées est constitutive dans nos conditions d'expérimentation. Cette hypothèse peut s'expliquer par le fait que les composants de bases Skp1, Cullin1 et Rbx1 servent dans de multiples complexes SCF (Ni et al, 2004), et sont impliqués dans de nombreux processus fondamentaux. La spécificité du complexe provient de la sous-unité F-box mais aussi partiellement de la sous-unité SKP1. Nous avons donc supposé une expression constitutive des trois sous-unités Rbx1, Cullin1 et Skp1, et une variation spécifique de l'expression de la sous-unité F-box, en réponse au traitement hormonal.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le complexe SKP1-Cullin1-F-box est macromoléculaire et très modulable qui peut exercer son activité ubiquitine ligase dans un très grand nombre de voies de régulation dans la cellule. Identifier les acteurs de ce complexe, ainsi que les interactions entre effecteurs, est donc très important pour la compréhension du rôle de la voie UPS chez le blé.

L'objectif premier de mes travaux de thèse était la caractérisation biochimique et moléculaire des trois sous-unités SCF majeures : Skp1, Cullin1 et Rbx1. Nous avons obtenu des clones bactériens contenant des séquences complètes des gènes Skp1 et Cullin1. Ces clones sont potentiellement utilisables pour produire des protéines recombinantes fonctionnelles *in vitro* et des anticorps spécifiques.

Nous avons réalisé l'étude de l'expression des gènes Skp1, Cullin1 et Rbx1. Nous avons démontré une expression constitutive de ces trois protéines dans nos conditions expérimentales, ce qui laisse penser que ces protéines assurent des fonctions de base chez le blé.

Dans une seconde partie de notre travail, un criblage double-hybride nous a permis de connaître certains partenaires du complexe SCF chez le blé ; TSK1-ZTL, TSK1-ATFbl5 et TSK3-ZTL, TSK3-ATFbl5. Le fait de trouver que des protéines SKP1 interagissent avec des protéines F-box nous suggère leurs rôles dans la formation de différents complexes SCF ainsi que leurs implications dans la régulation de la voie de protéolyse ubiquitine 26S.

Le système double-hybride est une méthode relativement récente, prometteuse et qui présente de nombreux avantages. Cependant, cette méthode a montré ses limites au cours de ce travail, d'autres systèmes *in vivo*, tels que le GST-pulldown ou la co-immunoprécipitation ou le BiFC (Bimolecular Fluorescent Complementation), pourront sans doute apporter des solutions pour remédier notamment au problème d'autoactivation. Néanmoins, notre travail a contribué à la caractérisation de différentes protéines impliquées dans la voie ubiquitine protéasome 26S et les différents partenaires mis en évidence restent des candidats intéressants qui pourraient être étudiés par la suite.

En combinant des analyses bio-informatiques et biochimiques, une protéine nommée Tsk11 a particulièrement retenu notre attention. Elle se caractérise par des propriétés

structurales et fonctionnelles particulières par comparaison avec les autres protéines TSKs. Les résultats que nous avons obtenus en étudiant les interactions de différentes protéines chimériques TSKs avec plusieurs de ses partenaires laissent à penser que cette protéine possède une structure atypique mais intéressante pour accomplir diverses interactions fonctionnelles. Donc, il est tout à fait possible que TSK11 soit une protéine de type « Skp1 » assurant la mise en contact d'autres protéines devant interagir entre elles dans la voie UPS.

Au final, cette thèse ouvre de nombreuses perspectives :

Analyse d'extraits protéiques, anticorps anti-protéines

Nous avons montré l'absence de variation au niveau transcriptionnel, de l'expression des sous-unités du complexe SCF chez le blé, sous différents traitements hormonaux. Il sera maintenant important de montrer ce qu'il en est au niveau des protéines (régulation au niveau post-traductionnel). L'étude de l'expression des protéines nécessite la production d'anticorps anti-protéines, qui passe par la production de protéines recombinantes complètes, à partir des clones que nous avons obtenus. Les protéines recombinantes pourront être purifiées pour produire des anticorps anti-protéines spécifiques des sous-unités du complexe SCF. La production d'anticorps est très coûteuse. De tels anticorps spécifiques d'*A. thaliana*, sont disponibles dans d'autres laboratoires, mais semblent ne pas reconnaître les sous-unités chez le blé. Une technique moins coûteuse, mais également moins fiable est la production d'anticorps anti-peptides. Cette technique permet un gain de temps important, les anticorps étant synthétisés à partir de la séquence nucléotidique, et non pas à partir des protéines recombinantes.

Dans un premier temps, les protéines totales seront extraites de plantules soumises à différents traitements (hormones, maladies ou stress physiologiques). Ces extraits de protéines totales seront alors analysés par hybridation avec les anticorps spécifiques anti-protéines ou anti-peptides.

Identification des F-box et des protéines cibles

Le laboratoire envisage également la production de protéines de fusion à partir de Skp1. Il existe principalement deux types de protéines de fusion : les GST et les Histag

(polyhistidine). Ces protéines de fusion pourront être utilisées pour identifier *in vitro* les F-box spécifiques de la protéine Skp1 fusionnée. La protéine fusionnée est fixée sur une colonne, un lysat cellulaire de plantules de blé est déposé sur cette colonne, puis la protéine fusionnée est purifiée et migrée sur gel en conditions dénaturantes (SDS-PAGE), pour permettre la séparation des différents fragments protéiques. Une hybridation sur membrane est ensuite réalisée avec les anticorps anti-protéines ou anti-tag (GST ou His), pour confirmer la présence de Skp1. Les fragments protéiques sont ensuite séquencés par MALDITOF (spectrométrie de masse) pour être identifiés.

L'identification des F-box dans des conditions physiologiques particulières permettra d'étudier le rôle de ces F-box. L'objectif, à terme, est d'identifier la protéine cible d'une F-box pour une condition physiologique donnée. Pour cela différentes banques cDNA double hybride issues d'organes à différents stades de développement de la plante de blé sont en cours de construction (thèse UMR GDEC). Le criblage de ces banques cDNA en utilisant les F-box identifiées comme appâts permettrait d'identifier des candidats potentiels. La capacité de ces candidats identifiés de se lier aux protéines F-box sera confirmée par plusieurs techniques telles que le pull-down, la co-immunoprécipitation ou encore la technique du BiFC. Le rôle des candidats identifiés dans la plante sera évalué en obtenant des plantes de blé transgéniques chez lesquelles l'expression de ces gènes sera affectée.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aasland, R., Stewart, A.F. and Gibson, T. (1996). The SANT domain: a putative DNA-binding domain in the SWI-SNF and ADA complexes, the transcriptional co-repressor N-CoR and TFIIIB. *Trends Biochem. Sci.*, **21**, 87–88.

Abel, S., Oeller, P. W. and Theologis, A. (1994). Early auxin-induced genes encode short-lived nuclear proteins. *Proc Natl Acad Sci.*, **1**, 326–330.

Adams, J. (2004). The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nature Reviews Cancer*, **4**, 349-360.

Akopian, T.N., kisselev, A.F. and Goldberg, A.L. (1997). Processive degradation of proteins and other catalytic properties of the proteasome from *Thermoplasma acidophilum*. *J. Biol. Chem.*, **272**, 1791-1798.

Alabadí, D., Oyama, T., Yanovsky, M.J., Harmon, F.G., Más, P. and Kay, S.A. (2001). Reciprocal regulation between *TOC1* and *LHY/CCA1* within the *Arabidopsis* circadian clock. *Science*, **293**, 880–883.

Alabadí, D., Yanovsky, M.J., Más, P., Harmer, S.L., and Kay, S.A. (2002). Critical role for CCA1 and LHY in maintaining circadian rhythmicity in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.*, **12**, 757–761.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, **215**, 403-410.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.*, **25**, 3389-3402.

Ardley, H. C. and Robinson, P.A. (2005). E3 ubiquitin ligases. *Essays Biochem.*, **41**, 15–30.

Bachmair, A., Novatchkova, M., Potuschak, T. and Eisenhaber, F. (2001). Ubiquitylation in plants: a post-genomic look at a post-translational modification. *Trends Plant Sci.*, **6**, 463–470.

Bai, C., Sen, P., Hofmann, K., Ma, L., Goebel, M., Harper, J.W. and Elledge, S.J. (1996). Skp1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell*, **86**, 263-274.

Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F. and Seemuller, E. (1998). The Proteasome: Paradigm of a Self-Compartmentalizing Protease. *Cell*, **92**, 367–380.

Ben-Saadon, R., Fajerman, I., Ziv, T., Hellman, U., Schwartz, A.L. and Ciechanover, A. (2004). The Tumor Suppressor Protein p16^{INK4a} and the Human Papillomavirus Oncoprotein-58 E7 Are Naturally Occurring Lysine-less Proteins That Are Degraded by the Ubiquitin System: Direct evidence for ubiquitination at the N-terminal residue. *J. Biol. Chem.*, **279**, 414146-41421.

- Binder, B.M., Walker, J.M., Gagne, J.M., Emborg, T.J., Hemmann, G., Bleecker, A.B. and Vierstra R.D. (2007).** The *Arabidopsis* EIN3 binding F-Box proteins EBF1 and EBF2 have distinct but overlapping roles in ethylene signaling. *Plant Cell*, **19**, 509–523.
- Bostick, M., Lochhead, S.R., Honda, A., Palmer S., and Callis, J. (2004).** Related to ubiquitin 1 and 2 are redundant and essential and regulate vegetative growth, auxin signaling, and ethylene production in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **16**, 2418–2432.
- Braun, B.C., Glickman, M., Kraft, R. Dahlmann, B., Kloetzel, P.M., Finley, D. and Schmidt, M. (1999).** The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat Cell Biol.*, **1**, 221–226.
- Browse, J. And Howe, G.A. (2008).** Update on jasmonate signaling: new weapons and a rapid response against insect attack. *Plant Physiol.*, **146**, 832–838.
- Browse, J. (2005).** Jasmonate: an oxylipin signal with many roles in plants. *Vitam Horm.*, **72**, 431–456.
- Borden, K.L. (2000).** RING domains: master builders of molecular scaffolds? *J Mol Biol*, **295**, 1103–1112.
- Cadwell, K. and Coscoy, L. (2005).** Ubiquitination on nonlysine residues by a viral e3 ubiquitin ligase. *Science*, **309**, 127–30.
- Carafoli, E., Molinari, M. (1998).** Calpain: a protease in search of a function? *Biochem Biophys Res Commun*, **247**, 193–203.
- Chae, H.S., Faure, F. And Kieber, J.J. (2003).** The *eto1*, *eto2*, and *eto3* mutations and cytokinin treatment increase ethylene biosynthesis in *Arabidopsis* by increasing the stability of ACs protein. *Plant Cell*, **15**, 545–559.
- Chen, Y.F., Shakeel, S.N., Bowers, J., Zhao, X.C., Etheridge, N., Schaller, G.E. (2007).** Ligand-induced degradation of the ethylene receptor ETR2 through a proteasome dependent pathway in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.*, **282**, 24752–24758.
- Chini, A., Fonseca, S., Fernández, G., Adie, B., Chico, J.M., Lorenzo, O., García-Casado, G., López-Vidriero, I., Lozano, F.M., Ponce, M.R., Micol, J.L., Solano, R. (2007).** The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature*, **448**, 666–671.
- Christians, M.J., Gingerich, D.J., Hansen, M., Binder, B.M., Kieber, J.J. and Vierstra R.D. (2009).** The BTB ubiquitin ligases ETO1, EOL1 and EOL2 act collectively to regulate ethylene biosynthesis in *Arabidopsis* by controlling type-2 ACCsynthase levels. *Plant J.* **57**, 332–345.
- Ciechanover, A., Schwartz, A.L. (1998).** The ubiquitin-proteasome pathway: the complexity and myriad functions of proteins death. *Proc Natl Acad Sci*, **95**, 2727–30.

- Ciechanover, A. and Ben-Saadon, R. (2004).** N-terminal ubiquitination: more protein substrates join in. *Trends Cell Biol*, **14**, 103–6.
- Ciechanover, A., Heller, H., Elias, S., Haas, A.L., Hershko, A. (1980).** ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. *Proc Natl Acad Sci*, **77**, 1365-1368.
- Ciechanover, A., Elias, S., Heller, H. and Hershko, A. (1982)** 'Covalent affinity' purification of ubiquitin activating enzyme. *J Biol Chem*, **257**, 2537–2542.
- Clos, J., Westwood, J.T., Becker, P.B., Wilson, S., Lambert, K. and Wu, C. (1990).** Molecular cloning and expression of a hexameric *Drosophila* heat shock factor subject to negative regulation. *Cell*, **63**, 1085–1097.
- Clough, R.C. and Vierstra, R.D. (1997).** Phytochrome degradation. *Plant Cell Environ.* **20**, 713–721.
- Coux, O., Tanaka, K. and Goldberg, A.L. (1996)** Structure and Functions of the 20S and 26S Proteasomes. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 801-847.
- Craig, K. L. and Tyers, M. (1999).** The F-box: a new motif for ubiquitin dependent proteolysis in cell cycle regulation and signal transduction. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, **72**, 299-328
- Craig, A., Ewan, R., Mesmar, J., Gudipati, V. and Sadanandom, A. (2009).** E3 ubiquitin ligases and plant innate immunity. *Journal of Experimental Botany*, **60**, 1123–1132.
- Cheo, D.L., Titus, S.A., Byrd, D.R.N., Hartley, J.L., Temple, G.F. and Brasch, M.A. 2004.** Concerted assembly and cloning of multiple DNA segments using in vitro site-specific recombination: Functional analysis of multi-segment expression clones. *Genome Res.*
- Connelly, C. and Hieter, P. (1996).** Budding yeast SKP1 encodes an evolutionarily conserved kinetochore protein required for cell cycle progression. *Cell*, **86**, 275–285.
- Chuang, H., Zhang, W., and Gray, W.M. (2004).** Arabidopsis ETA2, an apparent ortholog of the human cullin-interacting protein CAND1, is required for auxin responses mediated by the SCFTIR1 ubiquitin ligase. *Plant Cell*, **16**, 1883–1897.
- CIC (2009).** Conseil International des Céréales.
- Dharmasiri, N. and Estelle, M. (2004).** Auxin signaling and regulated protein degradation. *TRENDS in Plant Science*, **9**, 6.
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S. And Estelle, M. (2005).** The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, **435**, 441–445.
- Doré, C. and Varoquaux F. (2006).** Histoire et amélioration de 50 plantes cultivées. 144-145.

- Dazhong, Z., Weimin, N., Baomin, F., Tianfu, H., Megan, G.P., and Hong, M. (2003).** Members of the *Arabidopsis*-*SKP1*-like Gene Family Exhibit a Variety of Expression Patterns and May Play Diverse Roles in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **133**, 203–217.
- Del Pozo, J.C. and Estelle, M., (1999).** F-box proteins and protein degradation: An emerging theme in cellular regulation. *Plant Molecular Biology*, **44**, 123–128.
- del Pozo, J.C., Dharmasiri, S., Hellmann, H., Walker, L., Gray, W.M., Estelle, M. (2002).** AXR1-ECR1-dependent conjugation of RUB1 to the *Arabidopsis* Cullin AtCUL1 is required for auxin response. *Plant Cell*, **14**, 421–433.
- DeMartino, G.N., Gillette, T.G. (2007).** Proteasomes: machines for all reasons. *Cell*, **129**, 659–662.
- Escobar-Henriques, M., Westermann, B., and Langer, T. (2006).** Regulation of mitochondrial fusion by F-box by SCF protein Mdm30 involves proteasome-independent turnover of Fzo1. *J. Cell Biol.* **173**, 645–650.
- Etlinger, J.D., Goldberg, A.L. (1977).** A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes. *Proc Natl Acad Sci.* **74**, 54–58.
- Earley, K.W., Haag, J.R., Pontes, O., Opper, K., Juehne, T., Song, K. (2006).** Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *Plant J.*, **45**, 616–629.
- Escusa, S., Laporte, D., Massoni, A., Boucherie, H., Dautant, A. and Fournier, B.D. (2007).** Skp1-Cullin-F-box-dependent Degradation of Aah1p Requires Its Interaction with the F-box Protein Sslp1. *J Biol Chem.*, **282**, 20097–103.
- Feillet, P. (2000).** Le grain de blé. Composition et utilisation Publié par Editions Quae, ISBN 2738008968, 978, 2738008961 308.
- Feng, S., Shen, Y., Sullivan, J.A., Rubio, V. Xiong, Y., Sun, T.P., Deng, X.W. (2004).** *Arabidopsis* CAND1, an unmodified CUL1-interacting protein, is involved in multiple developmental pathways controlled by ubiquitin/proteasome-mediated protein degradation. *Plant Cell*, **16**, 1870–1882.
- Finley, D., Sadis, S., Monia, B.P., Boucher, P., Ecker, D.J, Crooke, S.T, Chau, V. (1994).** Inhibition of proteolysis and cell cycle progression in a multiubiquitination-deficient yeast mutant. *Mol Cell Biol.*, **14**, 5501–5509.
- Freemont, P.S., Hanson, I.M. and Trowsdale, J. (1991).** A novel cysteine-rich sequence motif. *Cell*, **64**, 483–484.
- Furukawa, M., Zhang, Y., McCarville, J., Ohta, T., Xiong, Y. (2000).** The CUL1 C-terminal sequence and ROC1 are required for efficient nuclear accumulation, NEDD8 modification, and ubiquitin ligase activity of CUL1, *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 8185– 8197.

Farras, R., Ferrando, A., Jasik, J., Kleinow, T., Okresz, L., Tiburcio, A., Salchert, K., del Pozo, C., Schell, J., Koncz, C. (2001). SKP1-SnRK protein kinase interactions mediate proteasomal binding of a plant SCF ubiquitin ligase. *EMBO J.* **20**, 2742-56.

Farras, R., Bossis, G., Andermarcher, E., Jariel-Encontre, I., and Piechaczyk, M. (2005). Mechanisms of delivery of ubiquitylated proteins to the proteasome: new target for anti-cancer therapy? *Crit Rev Oncol Hematol.*, **54**, 31-51.

Furukawa, M., Ohta, T., and Xiong, Y. (2002). Activation of UBC5 ubiquitin-conjugating enzyme by the RING finger of ROC1 and assembly of active ubiquitin ligases by all cullins. *J. Biol. Chem.*, **277**, 15758–15765.

Gagne, J.M., Downes, B.P., Shiu, S.H., Durski, A.M., Vierstra, R.D. (2002). The F-box subunit of the SCF E3 complex is encoded by a diverse superfamily of genes in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci.*, **99**, 11519–11524.

Galan, J.M., Wiederkehr, A., Seol, J.H., Haguenaer-Tsapis, R., Deshaies, R.J., Riezman, H., and Peter, M. (2001). Skp1p and the F-box protein Rcy1p form a non-SCF complex involved in recycling of the SNARE Snc1p in yeast. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 3105–3117.

Geoffrey M.C. (1999). La cellule: Une approche moléculaire Traduit par Camille François Collaborateur Camille François Publié par De Boeck Université, ISBN 2744500569, 978,2744500565706, 305.

Gilroy, S. and Jones, R.L. (1994). Perception of Gibberellin and Absciscic acid at the external face of the plasma membrane of barley (*Hordeum vulgare* L.) aleurone protoplasts. *Plant Physiol.*, **104**, 1185–1192.

Glickman, M.H., Ciechanover, A. (2002). The ubiquitin–proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction, *Physiol. Rev.*, **82**, 373–428.

Glichman, M.H., Rubin, D.M., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Baumeister, W., Fried, V.A. and Finley, D. (1998). Subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell*, **94**, 615-623.

Goldstein, A.L., Slater, F.D. and White, A. (1966). Preparation, assay, and partial purification of a thymic lymphocytopoietic factor (thymosin). *Proc Natl Acad Sci*, **56**, 1010–7.

Grant, B. and Greenwald, I. (1996). The *Caenorhabditis elegans sel-1* gene, a negative regulator of lin-12 and glp-1, encodes a predicted extracellular protein. *Genetics*, **143**, 237–247.

Gray, W.M., del Pozo, J.C., Walker, L., Hobbie, L., Risseuw, E., Banks, T., Crosby, W.L., Yang, M., Ma, H. and Estelle, M. (1999). Identification of an SCF ubiquitin-ligase complex required for auxin response in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.*, **13**, 1678-1691.

Green, R.M. and Tobin, E.M. (1999). Loss of the circadian clock-associated protein 1 in *Arabidopsis* results in altered clock-regulated gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **96**, 4176–4179.

Gomi, K., Sasaki, A., Itoh, H., Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M., Kitano, H., and Matsuoka, M. (2004). GID2, an F-box subunit of the SCF E3 complex, specifically interacts with phosphorylated SLR1 protein and regulates the gibberellin-dependent degradation of SLR1 in rice. *Plant J.* **37**, 626–634.

Guroff, G. and Guroff, G. (1964). A neutral calcium-activated proteinase from the soluble fraction of rat brain. *J. Biol. Chem.*, **239**, 149.

Hamilton, K.S., Ellison, M.J., Barber, K.R., Williams, R.S., Huzil, J.T., Mckenna, S., Ptak, C., Glover, M. and Shaw, G.S. (2001). Structure of a conjugating enzyme-ubiquitin thiolester intermediate reveals a novel role for the ubiquitin tail. *Structure*, **9**, 897-904.

Haas, A.L. and Siepmann, T.J. (1997). Pathways of ubiquitin conjugation. *FASEB J.*, **11**, 1257-1268.

Hatfield, P.M., Gosink, M.M., Carpenter, T.B. and Vierstra, R.D. (1997). The ubiquitin activating enzyme (E1) gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **11**, 213-26.

Hecketsweiler, B. (2004). Voyage en biochimie: Circuits en biochimie humaine, nutritionnelle et métabolique. Publié par Elsevier Masson, ISBN 2842995473, 9782842995478 72.

Hermend, D. Bamps, S., Tafforeau, L., Vandenhaute J. and Mäkelä, T. (2003). Skp1 and the F-box Protein Pof6 Are Essential for Cell Separation in Fission Yeast. *J. Biol. Chem.*, **278**, 9671-9677.

Hershko, A., Tomkins, G.M. (1971). Studies on the degradation of tyrosine amino transferase in hepatoma cells in culture. Influence of the composition of the medium and adenosine triphosphate dependence. *J Biol Chem.*, **246**, 710-714.

Hershko, A., Ciechanover, A., Heller, H., Haas, A.L., Rose, I.A. (1980). Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATPdependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci.*, **77**, 1783-1786.

Hershko, A., Ciechanover, A., and Varshavsky, A. (2000). Basic medical research award. the ubiquitin system. *Nat Med.*, **6**, 1073–1081.

Hershko, A. and Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem.*, **67**, 425-79.

Hochstrasser, M. (1996). Ubiquitin-Dependent Protein Degradation. *Annu. Rev. Genet.*, **30**, 405-439.

Hochstrasser, M. (2000). Biochemistry. All in the ubiquitin family. *Science*, **289**, 563-564.

- Hoecker, U. (2005).** Regulated proteolysis in light signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **8**, 469–476.
- Hoffman, L., Pratt, G., Rechsteiner, M. (1992).** Multiple forms of the 20 S multicatalytic and the 26 S ubiquitin/ATP-dependent proteases from rabbit reticulocyte lysate. *J Biol Chem.*, **267**, 22362-22368.
- Hooley, R. (1994).** Gibberellins: perceptions, transduction and responses. *Plant Mol. Biol.* **26**, 1529–1555.
- Hope, I.A., Struhl, K. (1986).** Functional dissection of a eukaryotic transcriptional activator protein, GCN4 of yeast. *Cell*, **46**, 885-894.
- Hick, L. (2001).** Protein regulation by monoubiquitin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**, 195-201.
- Huq, E. (2006).** Degradation of negative regulators: a common theme in hormone and light signaling networks? *Trends Plant Sci.*, **11**, 4-7.
- Hellmann, H. and Estelle, M. (2002).** Plant development: regulation by protein degradation. *Science*, **297**, 793-797.
- Hershko, A., Heller, H., Elias, S., and Chiechanover, A. (1983).** Components of ubiquitin-protein ligase system. *J. Biol. Chem.*, **258**, 8206-8214.
- Hartley, J.L., Temple, G.F., Brasch, M.A. (2000).** DNA cloning using *in vitro* site-specific recombination. *Genome Res.*, **10**, 1788-1795.
- Hicke, L., Schubert, H.L., Hill, C.P; (2005).** Ubiquitin-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 610-621.
- Higgins, D.G. and Sharp, P.M. (1989).** Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer, *Comput Appl Biosci.*, **5**, 151-153.
- Hua, J., Meyerowitz, E.M. (1998).** Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell*, **94**, 261-271.
- Huang, X. and Madan, A. (1999).** CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res.*, **9**, 868-877.
- Jacobsen, S.E. and Olszewski, N.E. (1993).** Mutations at the *SPINDLY* locus of *Arabidopsis* alter gibberellin signal transduction. *Plant Cell*, **5**, 887–896.
- Jain, M., Nijhawan, A., Arora, R., Agarwal, P., Ray, S., Sharma, P., Kapoor, S., Tyagi, A.K., and Khurana, J.P. (2007).** F-box Proteins in Rice: Genome-wide Analysis, Classification, Temporal and Spatial Gene Expression during Panicle and Seed Development, and Regulation by Light and Abiotic Stress. *Plant Physiology*, **143**, 1467-1483.
- Jarillo, J.A., Capel, J., Tang, R.H., Yang, H.Q., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Cashmore, A.R. (2001).** An *Arabidopsis* circadian clock component interacts with both CRY1 and phyB. *Nature*, **410**, 487–490.

- Jin, J., Cardozo, T., Lovering, R.C., Elledge, S.J., Pagano, M., Harper, J.W. (2004).** Systematic analysis and nomenclature of mammalian F-box proteins. *Genes Dev*, **18**, 2573-2580.
- Johnson, P.R., Ecker, J.R., (1998).** The ethylene gas signal transduction pathway: a molecular perspective. *Ann Rev. Genet.*, **32**, 227-254.
- Joo, S., Liu, Y., Lueth, A. & Zhang, S. (2008).** MAPK phosphorylation-induced stabilization of ACs6 protein is mediated by the non-catalytic C-terminal domain, which also contains the *cis*-determinant for rapid degradation by the 26s proteasome pathway. *Plant J.*, **54**, 129–140.
- Jones, J.D., Dangl, J.L. (2006).** The plant immune system. *Nature*, **444**, 323–329.
- Jackson, P.K., Eldridge, A.G. (2002).** The SCF ubiquitin ligase: an extended look. *Mol Cell*, **9**, 923-5.
- Katsir, L., Chung, H.S., Koo, A. J.K. and Gregg, A. (2008).** How Jasmonate signaling: a conserved mechanism of hormone sensing. *Current Opinion in Plant Biology*, **11**, 428–435.
- Kaplan, K.B., Hyman, A.A. and Sorger, P.K. (1997).** Regulating the yeast kinetochore by ubiquitin-dependent degradation and Skp1p-mediated phosphorylation. *Cell*, **91**, 491–500.
- Keegan, L., Gill, G., Ptashne, M. (1986).** Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science*, **231**, 699-704.
- Kepinski, S. and Leyser, L., (2005).** The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, **435**, 446-451.
- Kerscher, O., Felberbaum, R., and Hochstrasser, M. (2006).** Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **22**, 159–80.
- Kihara, H., Nishiyama, I. (1930).** Genomanalyse bei Triticum und Aegilops. *Cytologia*, **1**, 263–284.
- Guroff, G., Guroff, G. (1964).** A neutral calcium-activated proteinase from the soluble fraction of rat brain. *J Biol Chem.*, **239**, 149.
- Kipreos, E.T. and Pagano, M. (2000).** The F-box protein family. *Genome Biology*, **1**, 3002.
- Kipreos, E.T., Lander, J.P. Wing, W.W. He, and E.M. Hedgecock. (1996).** *cul-1* is required for cell cycle exit in *C. elegans* and identifies a novel gene family. *Cell*, **85**, 829-839.
- Kuroda, H., Takahashi, N., Shimada, H., Seki, M., Shinozaki, K., Matsui, M. (2002).** Classification and expression analysis of *Arabidopsis* F-box-containing protein genes. *Plant Cell Physiol.*, **43**, 1073-1085.

- Koegl, M., Hoppe, T., Schlenker, S., Ulrich, H.D., Mayer, T.U., Jentsch, S. (1999).** A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell*, **96**, 635-644.
- Kominami, K., Ochotorena, I. and Toda, T. (1998).** Two F-box/WD-repeat proteins Pop1 and Pop2 form hetero- and homo-complexes together with cullin-1 in the fission yeast SCF (Skp1-Cullin-1-F-box) ubiquitin ligase. *Genes Cells*, **3**, 721-735.
- Kondo-Okamoto, N., Ohkuni, K., Kitagawa, K., McCaffery, J.M., Shaw, J.M., Okamoto, K. (2006).** The novel F-box protein Mfb1p regulates mitochondrial connectivity and exhibits asymmetric localization in yeast. *Mol Biol Cell*, **17**, 3756-3767.
- Kong, H.Z., Leebens-Mack, J., Ni, W.M., dePamphilis, C.W. and Ma, H. (2004).** Highly heterogeneous rates of evolution in the SKP1 gene family in plants and animals: functional and evolutionary implications. *Mol. Biol. Evol.* **21**, 117-128.
- Kieber, J.J., Rothenberg, M., Roman, G., Feldmann, K.A., Ecker, J.R. (1993).** CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in Arabidopsis, encodes a member of the Raf family of protein kinases. *Cell*, **72**, 427-441.
- Kende, H. (1993).** Ethylene biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **44**, 283-307.
- Kong, H., Landherr, L.L., Frohlich, M.W., Leebens-Mack, J., Ma, H., and Depamphilis, C.W. (2007).** Patterns of gene duplication in the plant *SKP1* gene family in angiosperms: Evidence for multiple mechanisms of rapid gene birth. *Plant J.*, **50**, 873-885.
- Kamura, T., Koepp, D.M., Conrad, M.N, Skowyra, D., Moreland, R.J., Iliopoulos, O., Lane, W.S., Kaelin, W.G. Jr., Elledge, S.J., Conaway, R.C., Harper, J.W., Conaway, J.W. (1999).** "Rbx1, a component of the VHL tumor suppressor complex and SCF ubiquitin ligase". *Science*, **284**, 657-61.
- Lammer, D., Mathias, N., Laplaza, J.M., Jiang, W., Liu, Y., Callis, J., Goebel, M., Estelle, M. (1998).** Modification of yeast Cdc53p by the ubiquitinrelatedprotein Rub1p affects function of the SCFCdc4 complex, *Genes Dev.*, **12**, 914- 926.
- H. Lodish, A. Berk, P. Matsudaira, C. A. Kaiser, James Darnell, Monty Krieger, Matthew P. Scott, Pierre L. Masson, S. Laurence ZipurskyTraduit par Pierre L. Masson, Chrystelle Sanlaville (2005).** Biologie moléculaire de la cellule Collaborateur Stefan N. Constantinescu Edition: 3 Publié par De Boeck Université, 71-72.
- Lincoln, C., Britton, J.H., Estelle, M., (1990).** Growth and development of the axr1 mutants of Arabidopsis. *Plant Cell*, **2**, 1071-1080.
- Linghui, X., Fuquan, L., Esther, L., Pascal, G., Crosby W.L., Hong, M., Wen, P., Dafang, H., Daoxin, X. (2002).** The SCF (COI1) ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in Arabidopsis. *The Plant cell*, **14**, 1919-35.
- Littlewood, T.D. and Evan, G.I. (1995).** Transcription factors 2: helix-loop-helix. *Protein Profile*, **2**, 621-702.

- Liu, J., Furukawa, M., Matsumoto, T., Xiong, Y. (2002).** NEDD8 modification of CUL1 dissociates p120CAND1, an inhibitor of CUL1–SKP1 binding and SCF ligases, *Mol. Cell*, **10**, 1511–1518.
- Lloyd, J., Mason, R. (1996).** *Subcellular biochemistry : biology of the lysosomes*. New York Plenum Press.
- Lorick, K.L., Jensen, J.P., Fang, S., Ong, A.M., Hatakeyama, S. and Weissman, A.M. (1999).** RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **96**, 11364-11369.
- Lutterbach, B., Sun, D., Schuetz, J. and Hiebert, S.W. (1998).** The MYND motif is required for repression of basal transcription from the multidrug resistance 1 promoter by the t(8;21) fusion protein. *Mol. Cell Biol.*, **18**, 3604–3611.
- Lyapina, S., Cope, G., Shevchenko, A., Serino, G. Tsuge, T., Zhou, C. Wolf, D.A., Wei, N., Deshaies, R.J. (2001).** Promotion of NEDD–CUL1conjugate cleavage by COP9 signalosome, *Science*, **292**, 1382– 1385.
- Lechner, E., Achard, P., Vansiri, A., Potuschak, T., Genschik, P. (2006).** F-box proteins everywhere. *Curr Opin Plant Biol*, **9**, 631–638.
- Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685,
- Leyser, O. (2002).** Molecular genetics of auxin signaling. *Annu Rev Plant Biol.*, **53**, 377–398.
- Ma, H., dePamphilis, C. (2000).** The ABCs of floral evolution. *Cell*, **101**, 5–8.
- Makino, Y., Yoshida, T., Yogosawa, S., Tanaka, K., Muramatsu, M., Tamura, T.A. (1999).** Multiple mammalian proteasomal ATPases, but not proteasome itself, are associated with TATA-binding protein and a novel transcriptional activator, TIP120, *Genes Cells*, **4**, 529–539.
- Mathews, S. and Sharrock, R.A. (1997).** Phytochrome gene diversity. *Plant Cell Environ.*, **20**, 666–671.
- Mathias, N., Mathias, N., Johnson, S.L., Winey, M., Adams, A.E. M., Goetsch, L., Pringle, J.R., Byers, B., Goebel, M.G. (1996).** Cdc53p acts in concert with Cdc4p and Cdc34p to control the G1-to-S-phase transition and identifies a conserved family of proteins. *Mol Cell Biol.*, **16**, 6634-43.
- Mazzucotelli, E., Belloni, S., Marone, D., De Leonardis, A.M., Guerra, D., Fonzo, N., Di Cattivelli, L. and Mastrangelo, A.M. (2006).** The E3 Ubiquitin Ligase Gene Family in Plants: Regulation by Degradation. *Current Genomics*, **7**, 509-522 509.
- McGinnis, K.M., Thomas, S.G., Soule, J.D., Strader, L.C., Zale, J.M., Sun, T.P. and Steber, C.M. (2003).** The *Arabidopsis* SLEEPY1 gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase, *Plant Cell*, **15**, 1120–1130.

- Meijer L, Jezequel A, Roberge M. (2003).** Cell cycle regulators as therapeutic targets. In: *Progress in cell cycle research.*, **5**.
- Millner, P.A., (1995).** The auxin signal. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **7**, 224-231.
- Mizoguchi, T., Wheatley, K., Hanzawa, Y., Wright, L., Mizoguchi, M., Song, H.R., Carre, I.A. and Coupland, G. (2002).** *LHY* and *CCA1* are partially redundant genes required to maintain circadian rhythms in *Arabidopsis*. *Dev. Cell*, **2**, 629–641.
- Mudgil, Y., Shiu, S.-H., Stone, S.L., Salt, J.N. and Goring, D.R. (2004).** A large complement of the predicted *Arabidopsis* ARM repeat proteins are members of the U-Box E3 ubiquitin ligase family. *Plant Physiol.*, **134**, 59-66.
- Más, P., Kim, W.-Y., Somers, D.E. and Kay, S.A. (2003b).** Targeted degradation of TOC1 by ZTL modulates circadian function in *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, **426**, 567–570.
- Minella, A.C., Clurman, B.E., (2005).** Mechanisms of tumor suppression by the SCF (Fbw7). *Cell Cycle*, **4**, 1356–1359.
- Miller, J.H. (1972).** Experiments in Molecular Genetics (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).
- Magnani, E. Bartling, L. and Hake, S. (2006).** *BMC Molecular Biology*, **7**, 46 doi:10.1186/1471-2199-7-46.
- Maroof, S.M.A., Solima, K.M. Jorgenson R.A. and Allard, R.W. (1984).** Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **81**, 8014-8018.
- Marrocco, K. Lecureuil, A. Nicolas, P. and Guerche, P. (2003).** The *Arabidopsis* SKP1-like genes present a spectrum of expression profiles. *Plant Molecular Biology*, **52**, 715-727.
- Mazzucotelli, E., Belloni, S., Marone, D., De Leonardis, A.M., Guerra, D., Di Fonzo., Cattivelli, L., Mastrangelo, A.M., (2006).** The E3 ubiquitin ligase gene family in plants: regulation by degradation, *Curr, Gen*, **7**, 509–522
- Miller, J.H. (1992).** A Short Course in Bacterial Genetics. A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Nakayama, K.I., Hatakeyama, S., Nakayama, K. (2001).** Regulation of the cell cycle at the G1-S transition by proteolysis of cyclin E and p27Kip1. *Biochem Biophys Res Commun*, **282**, 853-60.
- Nelson, D.C., Lasswell, J., Rogg, L.E., Cohen, M.A. and Bartel, B. (2000).** *FKF1*, a clock-controlled gene that regulates the transition to flowering in *Arabidopsis*. *Cell*, **101**, 331–340.
- Ni, W., Xie, D., Hobbie, L., Zhao, D., Akkara, J., Ma, H. (2004).** Regulation of Flower Development in *Arabidopsis* by SCF Complexes. *Plant Physiology*, **134**, 1574-1585.

- Noben-Trauth, K., Naggert, J.K., North, M.A. and Nishina, P.M. (1996).** A candidate gene for the mouse mutation tubby. *Nature*, **380**, 534–538.
- Ng, R.W., Arooz, T., Yam, C.H., Chan, I. W., Lau, A.W., Poon, R.Y. (1998).** Characterization of the cullin and F-box protein partner Skp1. *FEBS Lett.* **438**, 183–9.
- Nayak, S., F.E. Santiago, H. Jin, D. Lin, T. Schedl and E. T. Kipreos. (2002).** The *Caenorhabditis elegans* Skp1-related gene family: diverse functions in cell proliferation, morphogenesis, and meiosis. *Curr. Biol.*, **12**, 277–287.
- Ozkan, E., Yu, H., and Deisenhofer, J. (2005).** Mechanistic insight into the allosteric activation of a ubiquitin-conjugating enzyme by ring-type ubiquitin ligases. *Proc Natl Acad Sci*, **102**, 18890–5.
- Olszewski, N., Sun, T.P., Gubler, F. (2002).** Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell*, **14**, 61–80.
- Osterlund, M.T., Ang, L.H., Deng, X.W. (1999).** The role of COP1 in repression of Arabidopsis photomorphogenic development. *Trends Cell Biol*, **9**, 113–118.
- Osterlund, M.T., Hardtke, C. S., Wei, N., Deng, X.W. (2000).** Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of Arabidopsis. *Nature*, **405**, 462–466.
- Pandey, A. and Mann M. (2000).** Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, **405**, 837–846.
- Pan, Z.Q., Kentsis, A., Dias, D.C., Yamoah, K., Wu, K. (2004).** Nedd8 on cullin: building an expressway to protein destruction, *Oncogene*, **23**, 1985– 1997.
- Pines, J. (1995).** Cyclins and cyclin-dependent kinase: a biochemical view. *Biochem J.*, **308**, 679–711.
- Patton, E.E., Willems, A.R., Sa, D., Kuras, L., Thomas, D., Craig, K.L., Tyers, M. (1998).** Cdc53 is a scaffold protein for multiple Cdc34/Skp1/F-box protein complexes that regulate cell division and methionine biosynthesis in yeast. *Genes Dev*, **12**, 692–705.
- Patton, E.E., Willems, A.R., Tyers, M. (1998).** Combinatorial control in ubiquitin-dependent proteolysis: don't Skp the F-box hypothesis. *Trends Genet.*, **14**, 236–43.
- Pazhouhandeh, M., Dieterle, M., Marrocco, K., Lechner, E., Berry, B., Brault, V., Hemmer, O., Kretsch, T., Richards, K.E., Genschik, P., Ziegler-Graff, V. (2006).** F-box-like domain in the poliovirus protein P0 is required for silencing suppressor function. *Proc Natl Acad Sci*, **103**, 1994–1999.
- Peifer, M. and Wieschaus, E. (1990).** The segment polarity gene *armadillo* encodes a functionally modular protein that is the *Drosophila* homolog of human plakoglobin. *Cell*, **63**, 1167–1176.

- Peng, Z., Shen, Y., Feng, S., Wang, X., Chittetei, B.N., Vierstra, R.D., Deng, X.W. (2003).** Evidence for a physical association of the COP9 signalosome, the proteasome, and specific SCF E3 ligases in vivo. *Curr Biol*, **13**, 504-505.
- Peters, J.M. (2002).** The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol Cell*, **9**, 931-43.
- Pickart, C.M. and Cohen, R.E. (2004).** Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 177-87.
- Pickart, C.M. (1995).** Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem*, **70**, 503-533.
- Pintard, L., Willis, J.H., Willems, A., Johnson, J.L., Srayko, M., Kurz, T., Glaser, S., Mains, P.E., Tyers, M., Bowerman, B., Peter, M. (2003).** The BTB protein MEL-26 is a substrate-specific adaptor of the CUL-3 ubiquitin-ligase. *Nature*, **425**, 311-316.
- Pintard, L. willems, A. and Peter, M. (2004).** Cullin based ubiquitin ligases: Cul 3- BTB complexes join the family. *The EMBO Journal*, **23**, 1681-1687.
- Podust, V.N., Brownell, J.E., Gladysheva, T.B., Luo, R.S., Wang, C. Coggins, M.B. Pierce, J.W., Lightcap, E.S., Chau, V. A. (2000).** Nedd8conjugation pathway is essential for proteolytic targeting of p27 byubiquitination, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **97**, 4579-4584.
- Ponting, C.P. and Aravind, L. (1997).** PAS: a multifunctional domain family comes to light. *Curr. Biol.*, **7**, 674-677.
- Potuschak, T., Lechner, E., Parmentier, Y., Yanagisawa, S., Grava, S., koncz, C. and Genschik, P. (2003).** EIN3-dependent regulation of plant ethylene hormone signaling by two *Arabidopsis* F box proteins: EBF1 and EBF2. *Cell*, **115**, 679-689.
- Pozo, J.C., Timpte, C., Tan, S., Callis, J., Estelle, M., (1998).** The ubiquitin-related protein RUB1 and auxin response in *Arabidopsis*. *Science*, **280**, 1760-1763.
- Parry, G. and Estelle, M. (2006).** Auxin receptors: a new role for Fbox proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **18**, 152-156.
- Porat R., P. Lu, and S.D. O'Neill. (1998).** *Arabidopsis* SKP1, a homologue of a cell cycle regulator gene, is predominantly expressed in meristematic cells. *Planta*, **204**, 345-351.
- Printen, J.A. and Sprague, G F.Jr (1994).** Protein-protein interactions in the yeast pheromone response pathway: Ste5p interacts with all members of the MAP kinase cascade. *Genetics*, **138**, 609-619.
- Querido, E., Blanchette, P., Yan, Q., Kamura, T., Morrison,M., Boivin, D., Kaelin, W.G., Conaway, R.C., Conaway, J.W., Branton, P.E. (2001).** Degradation of p53 by adenovirus E4orf6 and E1B55K proteins occurs via a novel mechanism involving a Cullin-containing complex. *Genes Dev*, **15**, 3104-3117.

- Reed, J. W. (2001).** Roles and activities of Aux/IAA proteins in Arabidopsis. *Trends in Plant Science*, **6**, 420-425.
- Feldman, R.M., Correll, C.C., Kaplan, K.B., Deshaies, R.J. (1997).** A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/Cullin catalyzes ubiquitinylation of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p. *Cell*, **91**, 221-30.
- Rubin, D.M., Glickman, M.H., Larsen, C.N., Dhruvakumar, S. and Finley, D. (1998).** Active site mutants in the six regulatory particle ATPases reveal multiple roles for ATP in the proteasome. *EMBO J.*, **17**, 4909-19.
- Risseeuw, E.P., Daskalchuk, T.E., Banks, T.W., Liu, E., Cotelesage, J., Hellmann, H., Estelle, M., Somers, D.E., Crosby, W.L. (2003).** Protein interaction analysis of SCF ubiquitin E3 ligase subunits from Arabidopsis. *Plant J*, **34**, 753–767.
- Sasaki, A., Itoh, H., Gomi, K., Ueguchi-Tanaka M., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Jeong, D.H., An, G., Kitano, H., Ashikari, M. and Matsuoka, M. (2003).** Accumulation of phosphorylated repressor for gibberellin signaling in an F-box mutant, *Science*, **299**, 1896–1898.
- Scheffner, M., Smith, S. Jentsch, S. (1998).** The ubiquitin-conjugation system. JM Peters, JR Harris, D Finley. *Ubiquitin and the Biology of the Cell*, New York, Plenum Press, 65-98.
- Schrammeijer, B., Risseeuw, E., Pansegrau, W., Regensburg-Tuink, T.J., Crosby, W.L., Hooykaas, P.J. (2001).** Interaction of the virulence protein VirF of *Agrobacterium tumefaciens* with plant homologs of the yeast Skp1 protein. *Current Biology*, **11**, 258–262.
- Schultz, T.F., Kiyosue, T., Yanovsky, M., Wada, M. and Kay, S.A. (2001).** A role for LKP2 in the circadian clock of Arabidopsis. *Plant Cell*, **13**, 2659–2670.
- Shwarz, S.E., Rosa, J.L., Scheffner. M. (1998).** Characterization of human HECT domain family members and their interaction with UbcH5 and UbcH7. *J Biol Chem*, **273**, 12148-12154.
- Schwechheimer, C. (2004).** The COP9 signalosome (CSN): an evolutionary conserved proteolysis regulator in eukaryotic development. *Biochim Biophys Acta*, **1695**, 45-54.
- Schwechheimer, C., Serino, G., Deng, X.W. (2002).** Multiple ubiquitin ligasemediated processes require COP9 signalosome and AXR1 function, *Plant Cell*, **14**, 2553– 2563.
- Schwechheimer, C., Serino, G., Callis, J., Crosby, W.L., Lyapina, S., Deshaies, R.J., Gray, W.M., Estelle, M., Deng, X.W. (2001).** Interactions of the Cullin-containing E3 ubiquitin ligases mediating auxin response. *Science*, **292**, 1379-1382.
- Schwessinger, B., Zipfel, C. (2008).** News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, **11**, 389–395.
- Seo, H. S., Yang, J.Y., Ishikawa, M., Bolle, C., Ballesteros, M.L. and Chua, N.H. (2003).** LAF1 ubiquitination by COP1 controls photomorphogenesis and is stimulated by SPA1. *Nature*, **423**, 995–999.

- Shen, W., Parmentier, Y., Hellmann, H., Lechner, E., Masson, A.D.J., Granier, F., Lepiniec, L., Estelle, M. and Genschik P. (2002).** Null mutation of *AtCUL1* causes arrest in early embryogenesis in *Arabidopsis*. *Mol. Biol. Cell*, **13**, 1916-1928.
- Shen, H., Moon, J. and Huq, E. (2005).** PIF1 is regulated by light-mediated degradation through the ubiquitin-26S proteasome pathway to optimize seedling photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant J.*, **44**, 1023–1035.
- Sheterline, P., Clayton, J. and Sparrow, J. (1995).** Actin. *Protein Profile*, **2**, 1–103.
- Simpson, M.V. (1953).** The release of labeled amino acids from the proteins of rat liver slices. *J Biol Chem.*, **201**, 143-154.
- Skowyra, D., Craig, K.L., Tyers. M., Elledge, S.J, Harper, J.W. (1997).** F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell*, **91**, 209-19.
- Small, I.D. and Peeters, N. (2000).** The PPR motif – a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins. *Trends Biochem. Sci.*, **25**, 46–47.
- Smyth, D.R., Bowman, J.L., Meyerowitz, E.M. (1990).** Early flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **2**, 755–767.
- Somers, D.E., Schultz, T.F., Milnamow, M. and Kay, S.A. (2000).** *ZEITLUPE* encodes a novel clock-associated PAS protein from *Arabidopsis*. *Cell*, **101**, 319–329.
- Sorger, P.K. (1991).** Heat shock factor and the heat shock response. *Cell*, **65**, 363–366.
- Steber, C.M., Cooney, S.E., McCourt, P. (1998).** Isolation of the GA-response mutant *sly1* as a suppressor of *ABI1-1* in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, **149**, 509-521.
- Smalle, J., Vierstra, R.D. (2004).** The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu Rev Plant Biol.*, **55**, 555–590.
- Schulman, B.A., Carrano, A.C., Jeffrey, P.D., Bowen, Z., Kinnucan, E.R., Finnin, M.S., Elledge, S.J., Harper, J.W., Pagano, M., Pavletich, N.P. (2000).** Insights into SCF ubiquitin ligases from the structure of the Skp1-Skp2 complex. *Nature*, **408**, 381–386.
- Tateishi, K., Omata, M., Tanaka, K. and Chiba, T. (2001).** The NEDD8 system is essential for cell cycle progression and morphogenetic pathway in mice, *J. Cell Biol.*, **155**, 571–579.
- Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., Nomura, K., He, S.Y., Howe, G.A. and Browse, J. (2007).** JAZ repressor proteins are targets of the SCF (COI1) complex during jasmonate signalling. *Nature*, **448**, 661–665.
- Tyers, M. and Jorgensen, P. (2000).** Proteolysis and the cell cycle: with this RING I do thee destroy. *Curr Opin Genet Dev.*, **10**, 54-64.

Tyers, M., Willems. A.R. (1999). One ring to rule a superfamily of E3 ubiquitin ligases. *Science*, **284**, 601-604.

Tzfira, T., Vaidya, M., Citovsky, V.(2004). Involvement of targeted proteolysis in plant genetic transformation by *Agrobacterium*. *Nature*, **431**, 87–92.

Takahashi, N. Kuroda, H. Kuromori, T. Hirayama, T.Seki, M. Shinozaki, K. Shimada H. and Matsui. M. (2003). Expression and Interaction Analysis of Arabidopsis Skp1-Related Genes, *Plant and Cell Physiology*, **45**, 83-91.

Tagu, D., Lapeyrie, F., Ditengou, F., Lagrangem, H., Laurent, P., Missoum, N., Nehls, U., Martin, F. (2000). Molecular aspects of ectomycorrhiza development. In: Polldila G, Douds Jr DD, eds. Current advances in mycorrhizal research. St. Paul, MN: *American Phytopathological Society*, 69–90.

Ueguchi-Tanaka, M., Nakajima, M., Katoh, E., Ohmiya, H., Asano, K., Saji, S., Hongyu, X., Ashikari, M., Kitano, H. Yamaguchi. I. and Matsuoka, M. (2007). Molecular interactions of a soluble gibberellin receptor, GID1, with a rice DELLA protein, sLR1, and gibberellin. *Plant Cell*, **19**, 2140–2155.

Ullmann, A., Jacob, F., and Monod, J. (1967). Characterization by in vitro complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the beta-galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **24**, 339–343.

Voges, D., Zwicky, P. and Baumeister, W. (1999). The 26S proteasome : a molecular machine desined for controlled proteolysis.*Annu.Rev.Biochem.*, **68**,1015-1068.

Vierstra RD, (2009). The ubiquitin–26s proteasome system at the nexus of plant biology nature reviews, *Nat Rev Mol Cell Biol.* **10**, 385-97.

Vierstra RD, (2003). The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins, *Trends Plant Sci*, **8**, 135-142.

Varshavsky, A. (1996). The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **93**, 12142–12149.

Vidal, M., Braun, P., Chen, E., Boeke, J.D., and Harlow, E. (1996). *Proc.Natl. Acad. Sci.* **93**, 10321.

Wang, K.L., Li, H. and Ecker, J.R. (2002). Ethylene Biosynthesis and Signaling Networks.*Plant Cell*, **14**, 131–151.

Wang, X., Feng, S., Nakayama, N., Crosby, W.L., Irish, V., Deng, X.W. and Wei, N. (2003). The COP9 signalosome interacts with SCFUFO and participates in arabidopsis flower development, *Plant Cell*, **15**, 1071– 1082.

Wang, K.L., Yoshida, H., Lurin, C. and Ecker, J.R. (2004). Regulation of ethylene gas biosynthesis by the *Arabidopsis* ETO1 protein. *Nature*, **428**, 945–950.

- Wei, N., Deng, X.W. (2003).** The COP9 signalosome, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **19**, 261–286.
- Weissman, A.M. (1997).** Regulating protein degradation by ubiquitination. *Immunol. Today*, **18**, 189-198.
- Weissman AM. (2001).** Themes and variations on ubiquitylation. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol*, **2**, 169-178.
- Wilkinson, K.D., Urban, M.K. and Haas, A.L. (2005).** The ubiquitin signal: assembly, recognition and termination. *EMBO Rep.* **6**, 815-820.
- Willige, B.C., Ghosh, S., Nill, C., Zourelidou, M., Dohmann, E.M.N., Maier, A. and Schwechheimer, C.(2007).** The DELLA domain of GA INSENSITIVE mediates the interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A gibberellin receptor of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **19**, 1209–1220.
- Winston, J.T., Koepp, D.M., Zhu, C., Elledge, S.J. and Harper J.H. (1999).** A family of mammalian F-box proteins. *Curr. Biol.*, **9**, 1180–1182.
- Wolf, D.A., Zhou, C., Wee, S. (2003).** The COP9 signalosome: an assembly and maintenance platform for cullin ubiquitin ligases? *Nat Cell Biol*, **5**, 1029-1033.
- Wolf, D.H., Hilt, W., (2004).** The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1695**, 19–31
- Welcker, M., Larimore, E. A., Frappier, L. and Clurman, B.E. (2011).** Nucleolar Targeting of the Fbw7 Ubiquitin Ligase by a Pseudosubstrate and Glycogen Synthase Kinase, *Molecular and Cellular Biology*, **31**, 1214-1224.
- Xie, D.X., Feys, B.F., James, S., Nieto-Rostro, M. and Turner, J.G. (1998).** *COI1*: an *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science*, **280**, 1091–1094
- Xiong, Y. and Eickbush, T.H. (1990).** Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences. *EMBO J.*, **9**, 3353–3362.
- Xue, F. and Cooley, L. (1993).** Kelch encodes a component of intercellular bridges in *Drosophila* egg chambers. *Cell*, **72**, 681–693.
- Yang, M., Hu, Y., Lodhi, M., McCombie, W.R., Ma, H. (1999).** The Arabidopsis SKP1-LIKE1 gene is essential for male meiosis and may control homologue separation. *Proc Natl Acad Sci.*, **96**, 11416–11421.
- Yao, T., Cohen, R.E. (2002).** A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature*, **419**, 403-407.
- Yoshida, H., (2006).** The ACC synthase TOE sequence is required for interaction with ETO1 family proteins and destabilization of target proteins. *Plant Mol. Biol.*, **62**, 427–437.

Yuchu, G., Siung, H., Chang, H-C, Pellequer, J-L., Lavalley, R., Lanker, S. and Wittenberg, C. (2001). F-Box Protein Grr1 Interacts with Phosphorylated Targets via the Cationic Surface of Its Leucine-Rich Repeat. *Molecular and cellular biology*, 2506–2520.

Yamanaka, A., Yada, M., Imaki, H., Koga, M., Ohshima, Y., Nakayama, K., (2002). Multiple Skp1-related proteins in *Caenorhabditis elegans*: diverse patterns of interaction with Cullins and F-box proteins. *Curr. Biol.*, **12**, 267–275.

Zhang, H., Kobayashi, R., Galactionov, K., Beach, D. (1995). p19Skp1 and p45Skp2 are essential elements of the cyclin A-CDK2 S phase kinase. *Cell*, **82**, 915-925.

Zhao, D., Yang, M., Solava, J., Ma, H. (1999). The ASK1 gene regulates development and interacts with the UFO gene to control floral organ identity in *Arabidopsis*. *Dev Genet*, **25**, 209–223.

Zhao, D., Yu, Q., Chen, M., Ma, H. (2001b). The ASK1 gene regulates B function gene expression in cooperation with UFO and LEAFY in *Arabidopsis*. *Development*, **128**, 2735–2746.

Zhao, D., Ni, W., Feng, B., Han, T., Petrusek, M.G., and Ma, H., (2003). Members of the ASK gene family exhibit a variety of expression patterns and may play diverse roles in *Arabidopsis*, *Plant Physiol*, **133**, 203-217.

Zhao, D., Yu, Q., Chen, M. and Ma, H., (2001). The ASK1 gene regulates B function gene expression in cooperation with UFO and LEAFY in *Arabidopsis*, *Genes Dev*, **128**, 2735-2746.

Zheng, N., Schulman, B.A., Song, L., Miller, J.J., Jeffrey, P.D., Wang, P., Chu, C., Koepp, D.M., Elledge, S.J., Pagano, M., Conaway, R.C., Conaway, J.W., Harper, J.W., Pavletich, N.P. (2002). Structure of the Cull1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature*, **416**, 703-709.

Zhou, G.B., Meng, Q.G. and Li, N. (2010). In vitro derivation of germ cells from embryonic stem cells in mammals. *Mol. Reprod. Dev.* **77**, 586-594.

Zeng, L.R., Vega-Sanchez, M.E., Zhu, T., and Wang, G.L. (2006). Ubiquitination-mediated protein degradation and modification: an emerging theme in plant-microbe interactions. *Cell Research* **16**, 413-426.

Zhao, Y., Dai, X., Blackwell, H.E., Schreiber, S.L., Chory, J. (2003). SIR1, an upstream component in auxin signaling identified by chemical genetics. *Science*, **301**, 1107–1110.

Zhao, D., Ni, W., Feng, B., Han, T., Petrusek, M.G., Ma, H. (2003b). Members of the ASK gene family exhibit a variety of expression patterns and may play diverse roles in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **133**, 203–217.

Zhao, D., Yu, Q., Chen, M. and Ma, H. (2001). The ASK1 gene regulates B function gene expression in cooperation with UFO and LEAFY in *Arabidopsis*. *Development*, **128**, 2735–2746.

ANNEXES

Annexe 1 : Préparation des Tampons pour le test CPRG

Tampon 1

	<i>Pour 100ml de solution</i>
HEPES	2,38g
NaCl	0,9g
L-Aspartate hemi-Mg salt	0,065g
BSA	1,0g
Tween 20	50,0µl
H ₂ O	qsp 100ml

Dissoudre les différents composants dans 75ml d'eau ultra-pure. Ajuster le pH à 7,25-7,30. Verser la solution dans une éprouvette et ajuster au volume final avec de l'eau. Filtrer la solution sur une membrane de nitrocellulose (montée sur seringue) présentant des pores de 0,20µm. Stocker à 4°C à l'abri de la lumière 3 mois maximum.

Tampon 2

Dissoudre 27,1mg de CPRG (chlorophenol red-β-D-galactopyranoside) dans 20ml de tampon1 (la concentration finale en CPRG est alors de 2,23mM). Filtrer la solution sur une membrane de nitrocellulose (montée sur seringue) présentant des pores de 0,20µm. Stocker à 4°C à l'abri de la lumière 3 mois maximum.

Annexe 2 : Préparation des solutions de phytohormones

Préparation des solutions de phytohormones pour les pulvérisations

Pour 500 mL de 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4 D) 45 μM	PM (2,4) : 220,9 g/mol Préparation de 100 mL d'une SM (solution mère) de 2,4 D à 4,5 mM 0,099 g/100 mL 0,99 g/L \rightarrow SM 4,48 mM 5 mL de SM qsp 500 mL d'eau UP (d 1/100 ^e) \rightarrow SF (Solution Finale) 2,4 D à 44,8 μ M
500 mL Gibberellic Acid (GA3) 10⁻⁴M	PM GA3 : 346,37 g/mol $346,37 \times 10^{-4} = 34,637$ mg $34,637 / 2 = 17,32$ mg/ 500 mL = 0,0173 g/ 500 mL

Annexe 3 : Séquence Skp1 de blé complète (source : GenBank)

> AY316293 (822pb)

ACGATTAAGATTCAGTTTGACAAGTGATGACCACTGACCACGATAGGTCTTTCTTGTTGTCGCAAA
CATAACCACTGACCGTACATGTTACCGACACCACCTCATAGACTCCAGGATAATTACAACCCATT
ACGACAGACATAAAGAAGAGCGCTGAAATGCAGACATGACGAATACTAAGCGTTGTTTCGTTTCATT
CAACGCGGCGGCGGCATCGCCTGCCTAGATGCTCCTCTACTCAAAGGCCCACTGGTTCTCCCTGCG
GATCTCCTCCTCCTCCTCGGGCGTAAAGTCGTTCTTGATGTTGAAAGTCTTGCGGATCTCCTCTGGG
GTCTTGCCCTTGATCATGTGAGCAACAGTCTGGCAGGTCAGGTCCGGCAGCCCCTTGATGTTTCAGGT
AGTTGGCAGCCAGGATGAGGTCGAAGAGGGTGGCCTGGTCGACCTTGACGAACTCGGCGTCCCAG
TTCTTGAGGTCCTCGGCGGGGGCGGCGGGGGCGGCGTCCGAGGCTCCGGCTCCGGCTCCGGCGGCA
GCCCCATCGGCGGGCTTGGCCTGGACGTGCTTGTGTCAGTACTCGATGACCTTGGAGAGGATCTTG
GAGTTGACGTTGGGGAGCGGGATGCCGTTGTCGGCGCAGTCGTCCTCGATCATGTGGCGGATCGTC
TGCGACTCCATGGCCACCGCCTCCTCCACCTCGAACTCCTCGCCGTCCGAGCTCTTGAGTGTGATCA
TCTTCTTCTCGCCGGCGTCTCCCGCGGCCCGCCATCGCCCGCTGCTGCTGGATCCGGACCGGGAGAC
GAAACCCTAGCGAGGAACTCTAGTCGCG

Annexe 4 : Alignement des clones Skp1 amplifiés par le couple d'amorce de 810 pb avec la séquence AY316293 (822pb)

```

R2_810-SF6 : -----*-----20-----*-----40-----*-----60-----*-----80-----*-----
R3_810-SF6 : -----GATTTCAGTTTGACAAGTGATGACCACTGACCAAGATAGGTTTTCTTGTGTGCGCAAAACATAACCACTGACCGAACATGTTTC : 81
R1_810-SF6 : -----GATTTCAGTTTGACAAGTGATGACCACTGACCAAGATAGGTTTTCTTGTGTGCGCAAAACATAACCACTGACCGAACATGTTTC : 82
F1_810-SF6 : -----GATTTCAGTTTGACAAGTGATGACCACTGACCAAGATAGGTTTTCTTGTGTGCGCAAAACATAACCACTGACCGAACATGTTTC : 82
F2_810-SF6 : -----GATTTCAGTTTGACAAGTGATGACCACTGACCAAGATAGGTTTTCTTGTGTGCGCAAAACATAACCACTGACCGAACATGTTTC : 82
F3_810-SF6 : -----GATTTCAGTTTGACAAGTGATGACCACTGACCAAGATAGGTTTTCTTGTGTGCGCAAAACATAACCACTGACCGAACATGTTTC : 82
F2_810-T7 : ----- : -
F3_810-T7 : ----- : -
F1_810-T7 : ----- : -
822 : ACGATTAAAGATTTCAGTTTGACAAGTGATGACCACTGACCAAGATAGGTTTTCTTGTGTGCGCAAAACATAACCACTGACCGAACATGTTTC : 90

R2_810-SF6 : -----100-----*-----120-----*-----140-----*-----160-----*-----180-----
R3_810-SF6 : -----ACCGACACCACCTCATAGACTCCAGGATAATTACAACCCATTACGACAGACATAAAGAAGAGCGCTGAAATGCAGACATGACGAATACTA : 171
R1_810-SF6 : -----ACCGACACCACCTCATAGACTCCAGGATAATTACAACCCATTACGACAGACATAAAGAAGAGCGCTGAAATGCAGACATGACGAATACTA : 172
F1_810-SF6 : -----ACCGACACCACCTCATAGACTCCAGGATAATTACAACCCATTACGACAGACATAAAGAAGAGCGCTGAAATGCAGACATGACGAATACTA : 172
F2_810-SF6 : -----ACCGACACCACCTCATAGACTCCAGGATAATTACAACCCATTACGACAGACATAAAGAAGAGCGCTGAAATGCAGACATGACGAATACTA : 172
F3_810-SF6 : -----ACCGACACCACCTCATAGACTCCAGGATAATTACAACCCATTACGACAGACATAAAGAAGAGCGCTGAAATGCAGACATGACGAATACTA : 171
F2_810-T7 : ----- : -
F3_810-T7 : ----- : -
F1_810-T7 : ----- : -
822 : -----ACCGACACCACCTCATAGACTCCAGGATAATTACAACCCATTACGACAGACATAAAGAAGAGCGCTGAAATGCAGACATGACGAATACTA : 180

R2_810-SF6 : -----*-----200-----*-----220-----*-----240-----*-----260-----*-----
R3_810-SF6 : -----AGCGTTGTTTCGTTTCATTCAACCGCGCGCGCGGCATCGCCTGCGCTGATGCTCCTCTACTCAAAGGCCCACTGGTTCCTCCCTGCGGAATCTCC : 261
R1_810-SF6 : -----AGCGTTGTTTCGTTTCATTCAACCGCGCGCGCGGCATCGCCTGCGCTGATGCTCCTCTACTCAAAGGCCCACTGGTTCCTCCCTGCGGAATCTCC : 262
F1_810-SF6 : -----AGCGTTGTTTCGTTTCATTCAACCGCGCGCGCGGCATCGCCTGCGCTGATGCTCCTCTACTCAAAGGCCCACTGGTTCCTCCCTGCGGAATCTCC : 262
F2_810-SF6 : -----AGCGTTGTTTCGTTTCATTCAACCGCGCGCGCGGCATCGCCTGCGCTGATGCTCCTCTACTCAAAGGCCCACTGGTTCCTCCCTGCGGAATCTCC : 262
F3_810-SF6 : -----AGCGTTGTTTCGTTTCATTCAACCGCGCGCGCGGCATCGCCTGCGCTGATGCTCCTCTACTCAAAGGCCCACTGGTTCCTCCCTGCGGAATCTCC : 261
F2_810-T7 : ----- : 72
F3_810-T7 : ----- : 76
F1_810-T7 : ----- : 78
822 : -----AGCGTTGTTTCGTTTCATTCAACCGCGCGCGGCATCGCCTGCGCTGATGCTCCTCTACTCAAAGGCCCACTGGTTCCTCCCTGCGGAATCTCC : 270
      tcattcAACCGCGCGCGCGGCATCGCCTGCGCTGATGCTCCTCTACTCAAAGGCCCACTGGTTCCTCCCTGCGGAATCTCC

R2_810-SF6 : -----280-----*-----300-----*-----320-----*-----340-----*-----360-----
R3_810-SF6 : -----TCCTCCTCCGCGGGCGTAAAGTCGTTCTTGATGTTGAAGTCTTGCAGGATCTCCTCTGGGGTCTTGCCCTTGATCATGTGACGAACAGTCC : 351
R1_810-SF6 : -----TCCTCCTCCGCGGGCGTAAAGTCGTTCTTGATGTTGAAGTCTTGCAGGATCTCCTCTGGGGTCTTGCCCTTGATCATGTGACGAACAGTCC : 352
F1_810-SF6 : -----TCCTCCTCCGCGGGCGTAAAGTCGTTCTTGATGTTGAAGTCTTGCAGGATCTCCTCTGGGGTCTTGCCCTTGATCATGTGACGAACAGTCC : 352
F2_810-SF6 : -----TCCTCCTCCGCGGGCGTAAAGTCGTTCTTGATGTTGAAGTCTTGCAGGATCTCCTCTGGGGTCTTGCCCTTGATCATGTGACGAACAGTCC : 352
F3_810-SF6 : -----TCCTCCTCCGCGGGCGTAAAGTCGTTCTTGATGTTGAAGTCTTGCAGGATCTCCTCTGGGGTCTTGCCCTTGATCATGTGACGAACAGTCC : 351
F2_810-T7 : ----- : 162
F3_810-T7 : ----- : 166
F1_810-T7 : ----- : 168
822 : -----TCCTCCTCCGCGGGCGTAAAGTCGTTCTTGATGTTGAAGTCTTGCAGGATCTCCTCTGGGGTCTTGCCCTTGATCATGTGACGAACAGTCC : 360
      TCCTCCTCCGCGGGCGTAAAGTCGTTCTTGATGTTGAAGTCTTGCAGGATCTCCTCTGGGGTCTTGCCCTTGATCATGTGACGAACAGTCC

R2_810-SF6 : -----*-----380-----*-----400-----*-----420-----*-----440-----*-----
R3_810-SF6 : -----TGGCAGGTGAGGTTCGCGAGCCCTTGATGTTTCAGGTAGTTGGCAGCCAGGATGAGGTGGAAGAGGGTGGCTGGTGCACCTTGACGAAC : 441
R1_810-SF6 : -----TGGCAGGTGAGGTTCGCGAGCCCTTGATGTTTCAGGTAGTTGGCAGCCAGGATGAGGTGGAAGAGGGTGGCTGGTGCACCTTGACGAAC : 442
F1_810-SF6 : -----TGGCAGGTGAGGTTCGCGAGCCCTTGATGTTTCAGGTAGTTGGCAGCCAGGATGAGGTGGAAGAGGGTGGCTGGTGCACCTTGACGAAC : 442
F2_810-SF6 : -----TGGCAGGTGAGGTTCGCGAGCCCTTGATGTTTCAGGTAGTTGGCAGCCAGGATGAGGTGGAAGAGGGTGGCTGGTGCACCTTGACGAAC : 442
F3_810-SF6 : -----TGGCAGGTGAGGTTCGCGAGCCCTTGATGTTTCAGGTAGTTGGCAGCCAGGATGAGGTGGAAGAGGGTGGCTGGTGCACCTTGACGAAC : 441
F2_810-T7 : ----- : 252
F3_810-T7 : ----- : 256
F1_810-T7 : ----- : 258
822 : -----TGGCAGGTGAGGTTCGCGAGCCCTTGATGTTTCAGGTAGTTGGCAGCCAGGATGAGGTGGAAGAGGGTGGCTGGTGCACCTTGACGAAC : 450
      TGGCAGGTGAGGTTCGCGAGCCCTTGATGTTTCAGGTAGTTGGCAGCCAGGATGAGGTGGAAGAGGGTGGCTGGTGCACCTTGACGAAC

R2_810-SF6 : -----460-----*-----480-----*-----500-----*-----520-----*-----540-----
R3_810-SF6 : -----TCGCGGTCCGAGTCTTGAGTGTGATCAT----- : 470
R1_810-SF6 : -----TCGCGGTCCGAGTCTTGAGTGTGATCAT----- : 474
F1_810-SF6 : -----TCGCGGTCCGAGTCTTGAGTGTGATCAT----- : 471
F2_810-SF6 : -----TCGCGGTCCGAGTCTTGAGTGTGATCAT----- : 474
F3_810-SF6 : -----TCGCGGTCCGAGTCTTGAGTGTGATCAT----- : 473
F2_810-T7 : ----- : 284
F3_810-T7 : ----- : 288
F1_810-T7 : ----- : 290
822 : -----TCGCGGTCCGAGTCTTGAGTGTGATCAT----- : 537
      TC GCGGTCCGAGTCTTGAGTGTGATCAT G

R2_810-SF6 : -----*-----560-----*-----580-----*-----600-----*-----620-----*-----
R3_810-SF6 : -----CTTCTTCTCCGCGGCTCTCCGCGCGCGGATGCGCCCTGCTGCTGCTGGATCCGG-ACCGGGAGACCAACCGTAGCGAG : 552
R1_810-SF6 : -----CTTCTTCTCCGCGGCTCTCCGCGCGCGGATGCGCCCTGCTGCTGCTGGATCCGG-ACCGGGAGACCAACCGTAGCGAG : 556
F1_810-SF6 : -----CTTCTTCTCCGCGGCTCTCCGCGCGCGGATGCGCCCTGCTGCTGCTGGATCCGG-ACCGGGAGACCAACCGTAGCGAG : 553
F2_810-SF6 : -----CTTGGCTTGGAGC-TCCTGTTGCGTACGATGCTTGGAGAGG-TCCTGGAATTGACGTTGGGAGCGGATGCGGTTGCT : 558
F3_810-SF6 : -----CTTGGCTTGGAGC-TCCTGTTGCGTACGATGCTTGGAGAGG-TCCTGGAATTGACGTTGGGAGCGGATGCGGTTGCT : 558
F2_810-T7 : -----CTTGGCTTGGAGC-TCCTGTTGCGTACGATGCTTGGAGAGG-TCCTGGAATTGACGTTGGGAGCGGATGCGGTTGCT : 557
F3_810-T7 : -----CTTGGCTTGGAGC-TCCTGTTGCGTACGATGCTTGGAGAGG-TCCTGGAATTGACGTTGGGAGCGGATGCGGTTGCT : 372
F1_810-T7 : -----CTTGGCTTGGAGC-TCCTGTTGCGTACGATGCTTGGAGAGG-TCCTGGAATTGACGTTGGGAGCGGATGCGGTTGCT : 374
822 : -----GCGGGCTTGGCTTGGAGC-TCCTGTTGCGTACGATGCTTGGAGAGG-TCCTGGAATTGACGTTGGGAGCGGATGCGGTTGCT : 626
      CTT CT G CG G T GC G C G CC G G G I TGGA G GGG CG A C G

R2_810-SF6 : -----*-----640-----*-----660-----*-----680-----*-----700-----*-----720-----
R3_810-SF6 : -----GAACTCTGAGT----- : 563
R1_810-SF6 : -----GAACTCTGAGT----- : 567
F1_810-SF6 : -----GCGGCA----- : 564
F2_810-SF6 : -----GCGGCA----- : 570
F3_810-SF6 : -----GCGGCA----- : 572
F2_810-T7 : -----GCGGCA----- : 458
F3_810-T7 : -----GCGGCA----- : 462
F1_810-T7 : -----GCGGCA----- : 464
822 : -----GCGGCA----- : 716
      G C t g t

```

Annexe 5 : Séquence nucléotidique TSK16 présentant une délétion de 60 pb par rapport à la séquence AY316293 (822pb).

>TSK16 (753pb)

ACTAGAGTTTCCTCGCTAGGGTTTCGTCTCCCGGTCCGGATCCAGCAGCAGCAGCGGGCGATGGCG
GCCGCGGGAGACGCCGGCGAGAAGAAGATGATCACACTCAAGAGCTCGGACGGCGAGGAGTTCG
AGGTGGAGGAGGCGGTGGCCATGGAGTCGCAGACGATCCGCCACATGATCGAGGACGACTGCGCC
GACAACGGCATCCCGCTCCCCAACGTCAACTCCAAGATCCTCTCCAAGGTCATCGAGTACTGCAAC
AAGCACGTCCAGGCCAAGCCCGCCGAGGACCTCAAGAACTGGGACGCCGAGTTCGTCAAGGTCGA
CCAGGCCACCTCTTCGACCTCATCCTGGCTGCCAACTACCTGAACATCAAGGGGCTGCTGGACCT
GACCTGCCAGACTGTTGCTGACATGATCAAGGGCAAGACCCCAGAGGAGATCCGCAAGACCTTCA
ACATCAAGAACGACTTTACGCCCCGAGGAGGAGGAGGAGATCCGCAGGGAGAACCAGTGGGCCTTT
GAGTAGAGGAGCATCTAGGCAGGCGATGCCGCCGCCGCGTTGAATGAACGAACAACGCTTAGTAT
TCGTCATGTCTGCATTTACGCGCTCTTCTTTATGTCTGTCGTAATGGGTTGTAATTATCCTGGAGTCT
ATGAGGTGGTGTGCGGTGAACATGTTTCGGTCAGTGGTTATGTTTGCGACAACAAGAAAAACCTATCG
TGGTCAGTGGTCATCACTTGTCAAACCTGAATC

Annexe 6 : Séquences protéiques de Skp1

Séquence protéique du clone Skp1 F1 810

>F1_810-T7

1	ACT AGA GTT TCC TCG CTA GGG TTT CGT CTC CCG GTC CGG ATC CAG	45
1	Thr Arg Val Ser Ser Leu Gly Phe Arg Leu Pro Val Arg Ile Gln	15
46	CAG CAG CAG CGG GCG ATG GCG GCC GCG GGA GAC GCC GGC GAG AAG	90
16	Gln Gln Gln Arg Ala Met Ala Ala Ala Gly Asp Ala Gly Glu Lys	30
91	AAG ATG ATC ACA CTC AAG AGC TCG GAC GGC GAG GAG TTC GAG GTG	135
31	Lys Met Ile Thr Leu Lys Ser Ser Asp Gly Glu Glu Phe Glu Val	45
136	GAG GAG GCG GTG GCC ATG GAG TCG CAG ACG ATC CGC CAC ATG ATC	180
46	Glu Glu Ala Val Ala Met Glu Ser Gln Thr Ile Arg His Met Ile	60
181	GAG GAC GAC TGC GCC GAC AAC GGC ATC CCG CTC CCC AAC GTC AAC	225
61	Glu Asp Asp Cys Ala Asp Asn Gly Ile Pro Leu Pro Asn Val Asn	75
226	TCC AAG ATC CTC TCC AAG GTC ATC GAG TAC TGC AAC AAG CAC GTC	270
76	Ser Lys Ile Leu Ser Lys Val Ile Glu Tyr Cys Asn Lys His Val	90
271	CAG GCC AAG CCC GCC GAG GAC CTC AAG AAC TGG GAC GCC GAG TTC	315
91	Gln Ala Lys Pro Ala Glu Asp Leu Lys Asn Trp Asp Ala Glu Phe	105
316	GTC AAG GTC GAC CAG GCC ACC CTC TTC GAC CTC ATC CTG GCT GCC	360
106	Val Lys Val Asp Gln Ala Thr Leu Phe Asp Leu Ile Leu Ala Ala	120
361	AAC TAC CTG AAC ATC AAG GGG CTG CTG GAC CTG ACC TGC CAG ACT	405
121	Asn Tyr Leu Asn Ile Lys Gly Leu Leu Asp Leu Thr Cys Gln Thr	135
406	GTT GCT GAC ATG ATC AAG GGC AAG ACC CCA GAG GAG ATC CGC AAG	450
136	Val Ala Asp Met Ile Lys Gly Lys Thr Pro Glu Glu Ile Arg Lys	150

>F1_810-SP6

91	CCC GCC GAG GAC CTC AAG AAC TGG GAC GCC GAG TTC GTC AAG GTC	135
31	Pro Ala Glu Asp Leu Lys Asn Trp Asp Ala Glu Phe Val Lys Val	45
136	GAC CAG GCC ACC CTC TTC GAC CTC ATC CTG GCT GCC AAC TAC CTG	180
46	Asp Gln Ala Thr Leu Phe Asp Leu Ile Leu Ala Ala Asn Tyr Leu	60
181	AAC ATC AAG GGG CTG CTG GAC CTG ACC TGC CAG ACT GTT GCT GAC	225
61	Asn Ile Lys Gly Leu Leu Asp Leu Thr Cys Gln Thr Val Ala Asp	75
226	ATG ATC AAG GGC AAG ACC CCA GAG GAG ATC CGC AAG ACC TTC AAC	270
76	Met Ile Lys Gly Lys Thr Pro Glu Glu Ile Arg Lys Thr Phe Asn	90
271	ATC AAG AAC GAC TTT ACG CCC GGG GAG GAG GAG GAG ATC CGC AGG	315
91	Ile Lys Asn Asp Phe Thr Pro Gly Glu Glu Glu Glu Ile Arg Arg	105
316	GAG AAC CAG TGG GCC TTT GAG TAG AGG AGC ATC CAG GCA GGC GAT	360
106	Glu Asn Gln Trp Ala Phe Glu End Arg Ser Ile Gln Ala Gly Asp	120
361	GCC GCC GCC GCG TTG AAT GAA CGA ACA ACG CTT AGT ATT CGT CAT	405
121	Ala Ala Ala Ala Leu Asn Glu Arg Thr Thr Leu Ser Ile Arg His	135
406	GTC TGC ATT TCA GCG CTC TTC TTT ATG TCT GTC GTA ATG GGT TGT	450
136	Val Cys Ile Ser Ala Leu Phe Phe Met Ser Val Val Met Gly Cys	150
451	AAT TAT CCT GGA GTC TAT GAG GTG GTG TCG GTG AAC ATG TTC GGT	495
151	Asn Tyr Pro Gly Val Tyr Glu Val Val Ser Val Asn Met Phe Gly	165
496	CAG TGG TTA TGT TTG CGA CAA CAA GAA AAA CCT ATC GTG GTC AGT	540
166	Gln Trp Leu Cys Leu Arg Gln Gln Glu Lys Pro Ile Val Val Ser	180
541	GGT CAT CAC TTG TCA AAC TGA ATC	564
181	Gly His His Leu Ser Asn End Ile	

>TC247468 TC165599 TC203294

119

Annexe 8 :

Alignement des clones Cullin1 complets séquencés à partir de l'amorce SP6

```

*      1940      *      1960      *      1980      *      2000
CCUL251221 : ----- : -
CCUL251222 : ----- : -
TC247468   : GATCTACTAAGCTTAGTTACTCTGAGATTGTAACACAGCTGAACCTGTCAGATGATGATGTTGTCGTTTGCTCCATTCT : 2000
CCUL255821 : ----- : -
CCUL255822 : ----- : -

*      2020      *      2040      *      2060      *      2080
CCUL251221 : -----CGAAATACAGATTCTTAGCAAGAACCAGCTGGTAGAACTATTTCGCCAATGATTCTTTTGAGTTCAA : 70
CCUL251222 : -----TACAGATTCTTAGCAAGAACCAGCTGGTAGAACTATTTCGCCAATGATTCTTTTGAGTTCAA : 65
TC247468   : CTCTCTTGCGCGAAATACAGATTCTTAGCAAGAACCAGCTGGTAGAACTATTTCGCCAATGATTCTTTTGAGTTCAA : 2080
CCUL255821 : -----C AATGATTCTTTTGAGTTCAA : 22
CCUL255822 : -----GCCAATGATTCTTTTGAGTTCAA : 24
                        gCcAATGATTCTTTTGAGTTCAA

*      2100      *      2120      *      2140      *      2160
CCUL251221 : TTGCAAAATTTACTGACAGGATGAGAGGATCAAGATACCCCTACCTCCTGTTCATGAGAGAGAAAAGGTTGTTGAGGAGG : 150
CCUL251222 : TTGCAAAATTTACTGACAGGATGAGAGGATCAAGATACCCCTACCTCCTGTTCATGAGAGAGAAAAGGTTGTTGAGGAGG : 145
TC247468   : TTGCAAGGACCCGAGGATGCAATTGATGCATCAATTGTGCGCATCATGAAGAGTCGCAAAAGTTATGGCCCATACACAG : 2160
CCUL255821 : TTGCAAAATTTACTGACAGGATGAGAGGATCAAGATACCCCTACCTCCTGTTCATGAGAGAGAAAAGGTTGTTGAGGAGG : 102
CCUL255822 : TTGCAAAATTTACTGACAGGATGAGAGGATCAAGATACCCCTACCTCCTGTTCATGAGAGAGAAAAGGTTGTTGAGGAGG : 104
                        TTC AAATTTACTGACAGGATGAG AGGATCAAGATACCCCTACCTCCTGTTCATGAGAGAGAAAAGGTTGTTGAGGAGG

*      2180      *      2200      *      2220      *      2240
CCUL251221 : TTGCAAGGACCCGAGGATGCAATTGATGCATCAATTGTGCGCATCATGAAGAGTCGCAAAAGTTATGGCCCATACACAG : 230
CCUL251222 : TTGCAAGGACCCGAGGATGCAATTGATGCATCAATTGTGCGCATCATGAAGAGTCGCAAAAGTTATGGCCCATACACAG : 225
TC247468   : TTGCAAGGACCCGAGGATGCAATTGATGCATCAATTGTGCGCATCATGAAGAGTCGCAAAAGTTATGGCCCATACACAG : 2240
CCUL255821 : TTGCAAGGACCCGAGGATGCAATTGATGCATCAATTGTGCGCATCATGAAGAGTCGCAAAAGTTATGGCCCATACACAG : 182
CCUL255822 : TTGCAAGGACCCGAGGATGCAATTGATGCATCAATTGTGCGCATCATGAAGAGTCGCAAAAGTTATGGCCCATACACAG : 184
                        TTGCAAGGACCCGAGGATGCAATTGATGCATCAATTGTGCGCATCATGAAGAGTCGCAAAAGTTATGGCCCATACaCAG

*      2260      *      2280      *      2300      *      2320
CCUL251221 : CTAGTTGCGCAATGTGTGGAGCAGCTCAGCCGCATGTTCAAGCCTGACTTCAAAGCAATCAAGAAGAGGATTGAAGATCT : 310
CCUL251222 : CTAGTTGCGCAATGTGTGGAGCAGCTCAGCCGCATGTTCAAGCCTGACTTCAAAGCAATCAAGAAGAGGATTGAAGATCT : 305
TC247468   : CTAGTTGCGCAATGTGTGGAGCAGCTCAGCCGCATGTTCAAGCCTGACTTCAAAGCAATCAAGAAGAGGATTGAAGATCT : 2320
CCUL255821 : CTAGTTGCGCAATGTGTGGAGCAGCTCAGCCGCATGTTCAAGCCTGACTTCAAAGCAATCAAGAAGAGGATTGAAGATCT : 262
CCUL255822 : CTAGTTGCGCAATGTGTGGAGCAGCTCAGCCGCATGTTCAAGCCTGACTTCAAAGCAATCAAGAAGAGGATTGAAGATCT : 264
                        CTAGTTGCGCAATGTGTGGAGCAGCTCAGCCGCATGTTCAAGCCTGACTTCAAAGCAATCAAGAAGAGGATTGAAGATCT

*      2340      *      2360      *      2380      *      2400
CCUL251221 : CATCACGAGGGATTACCTGGAGCGGGACAAGGACAACGCCAACACATACAGATATCTGGCTTGATTAGTATTTGGTGGTAG : 390
CCUL251222 : CATCACGAGGGATTACCTGGAGCGGGACAAGGACAACGCCAACACATACAGATATCTGGCTTGATTAGTATTTGGTGGTAG : 385
TC247468   : CATCACGAGGGATTACCTGGAGCGGGACAAGGACAACGCCAACACATACAGATATCTGGCTTGATTAGTATTTGGTGGTAG : 2400
CCUL255821 : CATCACGAGGGATTACCTGGAGCGGGACAAGGACAACGCCAACACATACAGATATCTGGCTTGATTAGTATTTGGTGGTAG : 342
CCUL255822 : CATCACGAGGGATTACCTGGAGCGGGACAAGGACAACGCCAACACATACAGATATCTGGCTTGATTAGTATTTGGTGGTAG : 344
                        CATCACGAGGGATTACCTGGAGCGGGACAAGGACAACGCCAACACATACAGATATCTGGCTTGATTAGTATTTGGTGGTAG

*      2420      *      2440      *      2460      *      2480
CCUL251221 : GTTGCAAGCTTGCTGATGTTGGCAGCTGCCGTGTGACGTTTCATGATACGCTCCAAACACTTGCTGCCATGTTGCAGCTT : 470
CCUL251222 : GTTGCAAGCTTGCTGATGTTGGCAGCTGCCGTGTGACGTTTCATGATACGCTCCAAACACTTGCTGCCATGTTGCAGCTT : 465
TC247468   : GTTGCAAGCTTGCTGATGTTGGCAGCTGCCGTGTGACGTTTCATGATGACGCTCCAAACACTTGCTGCCATGTTGCAGCTT : 2458
CCUL255821 : GTTGCAAGCTTGCTGATGTTGGCAGCTGCCGTGTGACGTTTCATGATACGCTCCAAACACTTGCTGCCATGTTGCAGCTT : 422
CCUL255822 : GTTGCAAGCTTGCTGATGTTGGCAGCTGCCGTGTGACGTTTCATGATACGCTCCAAACACTTGCTGCCATGTTGCAGCTT : 424
                        GTTGCAAGCTTGCTGATGTTGGCagctgcccgtgtc cgttcctgaTACGCTCCAA AACTTGCTGCCATGTTGCAGCTT

*      2500      *      2520      *      2540      *      2560
CCUL251221 : TTTTGGGGATTTCGGTTGCIATCTTCCCGGGCTGGCTCTATTTTGACATGGGTCGTCAGAAACACTATAGGCACTCTGA : 550
CCUL251222 : TTTTGGGGATTTCGGTTGCIATCTTCCCGGGCTGGCTCTATTTTGACATGGGTCGTCAGAAACACTATAGGCACTCTGA : 545
TC247468   : TTTTGGGGATTTCGGTTGCIATCTTCCCGGGCTGGCTCTATTTTGACATGGGTCGTCAGAAACACTATAGGCACTCTGA : 2538
CCUL255821 : TTTTGGGGATTTCGGTTGCIATCTTCCCGGGCTGGCTCTATTTTGACATGGGTCGTCAGAAACACTATAGGCACTCTGT : 502
CCUL255822 : TTTTGGGGATTTCGGTTGCIATCTTCCCGGGCTGGCTCTATTTTGACATGGGTCGTCAGAAACACTATAGGCACTCTGT : 504
                        TTTTGGGGATTTCGGTTGCIATCTTCCCGGGCTGGtCtATTTTGACATGGgTCGTCAGAAACACTA TAGGCA CTC

*      2580      *      2600      *      2620      *
CCUL251221 : GGAT----- : 554
CCUL251222 : GGAT----- : 549
TC247468   : GGTATAGAGGAGGCACCTCGGTACCACTGAATTATCCTTCTCATGCAGTGCAATTTAAGTATGACTTAGATT : 2610
CCUL255821 : GGTATAGAGGAGGCACCTCGGTACCACTGAATTATCCTTCTCATGCAGTG----- : 552
CCUL255822 : GGTATAGAGGAGGCACCTCGGTACCACTGAATTATCCTTCTCATGCAGTG----- : 554
                        GG T

```

	*	20	*	40	*	60	*	80	
CCUL251221 :	-----			CTCATCTCTCTCCTCCCCAAACCCACGCGGGCGACGGGCGCAACAGAACCC	:	50			
CCUL255821 :	-----			CTCATCTCTCTCCTCCCCAAACCCACGCGGGCGACGGGCGCAACAGAACCC	:	50			
CCUL251222 :	-----			CTCATCTCTCTCCTCCCCAAACCCACGCGGGCGACGGGCGCAACAGAACCC	:	50			
TC247468 :	CCACGCGTCCGCGCCCGCTCTCTCCACC			CTCATCTCTCTCCTCCCCAAACCCACGCGGGCGACGGGCGCAACAGAACCC	:	80			
CCUL255822 :	-----			CTCATCTCTCTCCTCCCCAAACCCACGCGGGCGACGGGCGCAACAGAACCC	:	50			
				CTCATCTCTCTCCTCCCCAAACCCACGCGGGCGACGGGCGCAACAGAACCC					
	*	100	*	120	*	140	*	160	
CCUL251221 :	CAGCCTCCTCTCTAGGGTTTGCGGCCGCCGTCTGGGGG			CGEAAAACCGGGCGGTACGGCGGCATGGCGGGGCCACGGGGC	:	129			
CCUL255821 :	CAGCCTCCTCTCTAGGGTTTGCGGCCGCCGTCTGGGGG			CGEAAAACCGGGCGGTACGGCGGCATGGCGGGGCCACGGGGC	:	130			
CCUL251222 :	CAGCCTCCTCTCTAGGGTTTGCGGCCGCCGTCTGGGGG			CGEAAAACCGGGCGGTACGGCGGCATGGCGGGGCCACGGGGC	:	129			
TC247468 :	CAGCCTCCTCTCTAGGGTTTGCGGCCGCCGTCTGGGGG			CGEAAAACCGGGCGGTACGGCGGCATGGCGGGGCCACGGGGC	:	159			
CCUL255822 :	CAGCCTCCTCTCTAGGGTTTGCGGCCGCCGTCTGGGGG			CGEAAAACCGGGCGGTACGGCGGCATGGCGGGGCCACGGGGC	:	129			
	CAGCCTCCTCTCTAGGGTTTGCGGCCGCCGTCTGGGGG			CGEAAAACCGGGCGGTACGGCGGCATGGCGGGGCCACGGGGC					
	*	180	*	200	*	220	*	240	
CCUL251221 :	AGGACCGCAAGACGATCGATCTGEAGGATGGGTGGGCGTTCATGCAGCGGGGCATCACCAAGCTCATCAACATCCTCGAG				:	209			
CCUL255821 :	AGGACCGCAAGACGATCGATCTGEAGGATGGGTGGGCGTTCATGCAGCGGGGCATCACCAAGCTCATCAACATCCTCGAG				:	210			
CCUL251222 :	AGGACCGCAAGACGATCGATCTGEAGGATGGGTGGGCGTTCATGCAGCGGGGCATCACCAAGCTCATCAACATCCTCGAG				:	209			
TC247468 :	AGGACCGCAAGACGATCGATCTGEAGGATGGGTGGGCGTTCATGCAGCGGGGCATCACCAAGCTCATCAACATCCTCGAG				:	239			
CCUL255822 :	AGGACCGCAAGACGATCGATCTGEAGGATGGGTGGGCGTTCATGCAGCGGGGCATCACCAAGCTCATCAACATCCTCGAG				:	209			
	AGGACCGCAAGACGATCGATCTGEAGGATGGGTGGGCGTTCATGCAGCGGGGCATCACCAAGCTCATCAACATCCTCGAG								
	*	260	*	280	*	300	*	320	
CCUL251221 :	GGCAAGCCGAGCCGAGTTCAGCTCCGAGGACTACATGATGCTCTACACGACGATATACAACATGTGCACGCAGAACCC				:	289			
CCUL255821 :	GGCAAGCCGAGCCGAGTTCAGCTCCGAGGACTACATGATGCTCTACACGACGATATACAACATGTGCACGCAGAACCC				:	290			
CCUL251222 :	GGCAAGCCGAGCCGAGTTCAGCTCCGAGGACTACATGATGCTCTACACGACGATATACAACATGTGCACGCAGAACCC				:	289			
TC247468 :	GGCAAGCCGAGCCGAGTTCAGCTCCGAGGACTACATGATGCTCTACACGACGATATACAACATGTGCACGCAGAACCC				:	319			
CCUL255822 :	GGCAAGCCGAGCCGAGTTCAGCTCCGAGGACTACATGATGCTCTACACGACGATATACAACATGTGCACGCAGAACCC				:	289			
	GGCAAGCC GAGCCGAGTTCAGCTCCGAGGACTACATGATGCTCTACACGACGATATACAACATGTGCACGCAGAAC CC								
	*	340	*	360	*	380	*	400	
CCUL251221 :	ACCGCAGCACTACTCGCAGCAGCTCTAAGCAAGTACCGCGAGGCGCTTCGAGGAGTACATCCGGGCCACGGTCTTGCCAT				:	369			
CCUL255821 :	ACCGCAGCACTACTCGCAGCAGCTCTAAGCAAGTACCGCGAGGCGCTTCGAGGAGTACATCCGGGCCACGGTCTTGCCAT				:	370			
CCUL251222 :	CCCGCAGCACTACTCGCAGCAGCTCTAAGCAAGTACCGCGAGGCGCTTCGAGGAGTACATCCGGGCCACGGTCTTGCCAT				:	369			
TC247468 :	CCCGCAGCACTACTCGCAGCAGCTCTAAGCAAGTACCGCGAGGCGCTTCGAGGAGTACATCCGGGCCACGGTCTTGCCAT				:	399			
CCUL255822 :	CCCGCAGCACTACTCGCAGCAGCTCTAAGCAAGTACCGCGAGGCGCTTCGAGGAGTACATCCGGGCCACGGTCTTGCCAT				:	369			
	CCCGCAGCACTACTCGCAGCAGCTCTAAGCAAGTACCGCGAGGCGCTTCGAGGAGTACATCCGGGCCACGGT CTGCCAT								
	*	420	*	440	*	460	*	480	
CCUL251221 :	CATTAAAAAGAGAAGCATGATGAGTTTATGCTCAGCAGAGCTGGTACAAAGGTGGTCAACCATAAAGTTATGGTTAGGTGG				:	449			
CCUL255821 :	CATTAAAAAGAGAAGCATGATGAGTTTATGCTCAGCAGAGCTGGTACAAAGGTGGTCAACCATAAAGTTATGGTTAGGTGG				:	450			
CCUL251222 :	CATTAAAAAGAGAAGCATGATGAGTTTATGCTCAGCAGAGCTGGTACAAAGGTGGTCAACCATAAAGTTATGGTTAGGTGG				:	449			
TC247468 :	CATTAAAAAGAGAAGCATGATGAGTTTATGCTCAGCAGAGCTGGTACAAAGGTGGTCAACCATAAAGTTATGGTTAGGTGG				:	479			
CCUL255822 :	CATTAAAAAGAGAAGCATGATGAGTTTATGCTCAGCAGAGCTGGTACAAAGGTGGTCAACCATAAAGTTATGGTTAGGTGG				:	449			
	CATTAAAAAGAGAAGCATGATGAGTTTATGCTCAGCAGAGCTGGTACAAAGGTGGTCAACCATAAAGTTATGGTTAGGTGG								
	*	500	*	520	*	540	*	560	
CCUL251221 :	CTTTCACGCTTTTTCCATTATCTTGACCGGIACCTTCATCACACGAGGTCGCTIACGCACTIAGAGATGTTGGGCTTAT				:	529			
CCUL255821 :	CTTTCACGCTTTTTCCATTATCTTGACCGGIACCTTCATCACACGAGGTCGCTIACGCACTIAGAGATGTTGGGCTTAT				:	530			
CCUL251222 :									

Annexe 9 : Séquences protéiques de Cullin1

Séquence protéique du clone Cullin1 2512

>CCUL251221-T7PROM-A1.ab1																6425				PR-SHORT-NV				602	
30	CAT	CTC	TCT	CCT	CCC	CAA	ACC	CCA	CGC	GGC	GAC	GGG	CGC	AAC	AGG	4714									
	His	Leu	Ser	Pro	Pro	Gln	Thr	Pro	Arg	Gly	Asp	Gly	Arg	Asn	Arg										
4815	ACC	CAG	CCT	CCT	CCT	CTA	GGG	TTT	GCG	GCC	GCC	GTC	GGG	GGC	GGA	9229									
	Thr	Gln	Pro	Pro	Pro	Leu	Gly	Phe	Ala	Ala	Ala	Val	Gly	Gly	Gly										
9330	AAA	CCG	GCG	GCT	ACG	GCG	GCG	ATG	GCG	GGC	CAC	GGG	CAG	GAC	CGC	13744									
	Lys	Pro	Ala	Ala	Thr	Ala	Ala	Met	Ala	Gly	His	Gly	Gln	Asp	Arg										
13845	AAG	ACG	ATC	GAT	CTG	GAG	GAT	GGG	TGG	GCG	TTC	ATG	CAG	CGG	GGC	18259									
	Lys	Thr	Ile	Asp	Leu	Glu	Asp	Gly	Trp	Ala	Phe	Met	Gln	Arg	Gly										
18360	ATC	ACC	AAG	CTC	ATC	AAC	ATC	CTC	GAG	GGC	AAG	CCC	GAG	CCG	CAG	22774									
	Ile	Thr	Lys	Leu	Ile	Asn	Ile	Leu	Glu	Gly	Lys	Pro	Glu	Pro	Gln										
22875	TTC	AGC	TCC	GAG	GAC	TAC	ATG	ATG	CTC	TAC	ACG	ACG	ATA	TAC	AAC	27289									
	Phe	Ser	Ser	Glu	Asp	Tyr	Met	Met	Leu	Tyr	Thr	Thr	Ile	Tyr	Asn										
27390	ATG	TGC	ACG	CAG	AAG	CCA	CCG	CAC	GAC	TAC	TCG	CAG	CAG	CTC	TAC	317104									
	Met	Cys	Thr	Gln	Lys	Pro	Pro	His	Asp	Tyr	Ser	Gln	Gln	Leu	Tyr										
318105	GAC	AAG	TAC	CGC	GAG	GCC	TTC	GAG	GAG	TAC	ATC	CGG	GCC	ACG	GTC	362119									
	Asp	Lys	Tyr	Arg	Glu	Ala	Phe	Glu	Glu	Tyr	Ile	Arg	Ala	Thr	Val										
363120	TTG	CCA	TCA	TTA	AAA	GAG	AAG	CAT	GAT	GAG	TTT	ATG	CTC	AGA	GAG	407134									
	Leu	Pro	Ser	Leu	Lys	Glu	Lys	His	Asp	Glu	Phe	Met	Leu	Arg	Glu										
408135	CTG	GTA	CAA	AGG	TGG	TCA	AAC	CAT	AAA	GTT	ATG	GTT	AGG	TGG	CTT	452149									
	Leu	Val	Gln	Arg	Trp	Ser	Asn	His	Lys	Val	Met	Val	Arg	Trp	Leu										
453150	TCA	CGC	TTT	TTC	CAT	TAT	CTT	GAC	CGG	TAC	TTC	ATC	ACA	CGG	AGG	497164									
	Ser	Arg	Phe	Phe	His	Tyr	Leu	Asp	Arg	Tyr	Phe	Ile	Thr	Arg	Arg										
>CCUL251221-SP6-A1.ab1																6425				PR-SHORT-NV				602	
9330	AGA	AGG	ATC	AAG	ATA	CCC	CTA	CCT	CCT	GTT	GAT	GAG	AAG	AAA	AAG	13744									
	Arg	Arg	Ile	Lys	Ile	Pro	Leu	Pro	Pro	Val	Asp	Glu	Lys	Lys	Lys										
13845	GTT	GTT	GAG	GAC	GTT	GAC	AAG	GAC	CGG	AGG	TAT	GCA	ATT	GAT	GCA	18259									
	Val	Val	Glu	Asp	Val	Asp	Lys	Asp	Arg	Arg	Tyr	Ala	Ile	Asp	Ala										
18360	TCA	ATT	GTG	CGT	ATC	ATG	AAG	AGT	CGC	AAA	GTT	ATG	GCC	CAT	ACA	22774									
	Ser	Ile	Val	Arg	Ile	Met	Lys	Ser	Arg	Lys	Val	Met	Ala	His	Thr										
22875	CAG	CTA	GTT	GCG	GAA	TGT	GTG	GAG	CAG	CTC	AGC	CGC	ATG	TTC	AAG	27289									
	Gln	Leu	Val	Ala	Glu	Cys	Val	Glu	Gln	Leu	Ser	Arg	Met	Phe	Lys										
27390	CCT	GAC	TTC	AAA	GCA	ATC	AAG	AAG	AGG	ATT	GAA	GAT	CTC	ATC	ACG	317104									
	Pro	Asp	Phe	Lys	Ala	Ile	Lys	Lys	Arg	Ile	Glu	Asp	Leu	Ile	Thr										
318105	AGG	GAT	TAC	CTG	GAG	CGG	GAC	AAG	GAC	AAC	GCC	AAC	ACA	TAC	AGA	362119									
	Arg	Asp	Tyr	Leu	Glu	Arg	Asp	Lys	Asp	Asn	Ala	Asn	Thr	Tyr	Arg										
363120	TAT	CTG	GCT	TGA	TTA	GTA	TTG	GTG	GTA	GGT	TGC	AAG	CTT	GCT	GAT	407134									
	Tyr	Leu	Ala	End	Leu	Val	Leu	Val	Val	Gly	Cys	Lys	Leu	Ala	Asp										
408135	GGT	GGC	AGC	TGC	CGT	GTC	ACG	TTC	ATG	ATA	CGC	TCC	AAT	GAC	TTG	452149									
	Gly	Gly	Ser	Cys	Arg	Val	Thr	Phe	Met	Ile	Arg	Ser	Asn	Asp	Leu										
453150	CTG	CGA	TGT	TGC	AGC	TTA	TTT	TGG	GGA	TTT	CGG	TTG	CTA	TCT	TCC	497164									
	Leu	Arg	Cys	Cys	Ser	Leu	Phe	Trp	Gly	Phe	Arg	Leu	Leu	Ser	Ser										
498165	CGG	GCT	GGT	CTC	ATT	TTG	TAC	ATG	GGT	CGT	CAG	AAA	CAC	TAT	TAG	542179									
	Arg	Ala	Gly	Leu	Ile	Leu	Tyr	Met	Gly	Arg	Gln	Lys	His	Tyr	End										
543180	GCA	ACT	CAG	GAT	554																				
	Ala	Thr	Gln	Asp																					

Annexe 10 : Résultats des BLAST des clones Rbx1 sur NCBI

Tableau de BLAST des clones Rbx1 sur NCBI

clone	code	nom	score	Value	cadre de lecture
CRBX4971A-SP6	gi 57900421 dbj BAD87657.1	Ras-related protein RIC1 [Oryza s...	209	3,00 ^E -53	-3
CRBX4971B-SP6	gi 57900421 dbj BAD87657.1	Ras-related protein RIC1 [Oryza s...	209	3,00 ^E -53	-3
CRBX4972A-SP6	gi 57900421 dbj BAD87657.1	Ras-related protein RIC1 [Oryza s...	209	3,00 ^E -53	-3
CRBX4972B-SP6	gi 57900421 dbj BAD87657.1	Ras-related protein RIC1 [Oryza s...	204	9,00 ^E -52	-3
GRBX497B1A-SP6	gi 18390100 gb AAL68845.1	putative GAG-POL precursor [Sorghum b	116	5,00 ^E -25	-2
GRBX497B1B-SP6	gi 15225510 ref NP_182079.1	CYP76C4; heme binding / iron ion...	33.5	4.4	-2
GRBX497B2A-SP6	gi 47846294 emb CAG30723.1	hypothetical protein [Hordeum vulgar	212	5,00 ^E -54	2
GRBX497B2B-SP6	gi 50928869 ref XP_473962.1	OSJNBa0053K19.28 [Oryza sativa (...]	33.1	0.010	-3
GRBX439B2A-SP6	gi 66801073 ref XP_629462.1	hypothetical protein DDB0184568 ...	37.4	0.31	3
GRBX439B2B-SP6	gi 66801073 ref XP_629462.1	hypothetical protein DDB0184568 ...	37.4	0.32	3

Annexe 11 : Séquences des Contigs de Rbx

>Contig1, 532 bases, A18FC7E5 checksum.

GTGAGACAAAAAAGAATGGCCACAGCAACTGCCTCGTCTGCCCCAGC
TCCCATCACTATTCGCATGAAGAAATGGATGCCAATCGGCTACTGGCGCT
TCCCATCCAACGTTAACGAGAGCTGTCCGGTCTGCCAGGAGCATCTCACT
CTCCGCTGCCTTGAGTGCCAGGCGAACGAGGGAACGAACTGTGGTCTTTC
CGTTCGGCTCATGTGGTCACGTCTTCCATGTTTGTGTATTGCTGGCTGG
GTGAAGAAGGATAAAGACAGCACTAAGACCTCTGTCCGCTCGATTTCCCG
GCCGTTGGGAACCTTCCGACAAGATTCCCCTTCTCTGAAGGCCCTGCCG
AATAATCAAATGATGAACCTCTTCCCCTTTTTGGTACAAANCTTCCTTNA
CAACTTCCCCTTGANTCCTGATCATATTNCAAGATGAATGACAACGGCTC
AAATCACTTTAGCGACANTCTCNTTTGCAACAACAAGCTCTCCTCTTTAA
AATGGGNTTGTTCNCTTCAAAAAAAAAAAAA

>Contig2, 671 bases, CD443FE6 checksum.

CCACGCGTCGCGGACGCGGGGGCGGACGCGGGGGTCCGGTCTCCCGTCTC
GCCTAGCCTCCTCCTGCCCTCCGCTCGCCTAGGGTTCGCTCGCGATGGAC
CAGGGCGACGTCGCCGTGGCCGTGCCCCCGCCGCCCTCCTCCTCCTG
CGCCGGCGCCGGCTGCAAGAAGGGCAAGCGCTTCGAGATCAAAAAGTGA
ACGCCGTCGCGCTCTGGGCTGGGACATCGTGGTCGACAACTGCGCCATC
TGCCGGAACCACATCATGGACCTCTGCATCGAGTGCCAGGCGAACAGGC
CAGCGCCACCAGCGAGGAGTGACCGTCGCTTGGGGAGTTTGCAACCATG
CATTCCACTTCCACTGCATCAGCCGTTGGCTCAAGACCCGTCAAGTGTGC
CCTCTAGACAACAGCGAGTGGGAGTTCAGAAAGTATGGTCACTAAGACAG
TCATGGCCAGGGGGCGAAGTTACTTATCATGGTTATCGTACTTTAGTGCTAT
TAGTGATAACTCCTGGTTAAGAATAAGTGGATGGGTGGTTGATGTTCTTG
AGCTTGGATTTTTGTAAACCATGCATCCTTGTGCACTACTGTTTCAGC
AAATCGTCCCTGAGAGCTACCGATGGATCTCTCTGTTTTCTGGAATTGA
AGTGTGAATTTGGTGGGTCTC

>Contig3, 726 bases, D76DEB77 checksum.

CCACGCGTCCGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGGGAGAGGATGTCGGCCATGG
AGACGGACGCCCCCGACGCGCCGCCGCCGGCCCCGGCCCCCGCCGCCGAC
GCCGGGGCCTCCTCCTCGTCTGCCGCAAGCCGGGCAAGCGCTTCGAGAT
CAAGAAGTGGAACGCCGTCGCGCTCTGGGCGTGGGACATCGTGGTGGACA
ACTGCGCCATCTGCCGCAACCACATCATGGATCTATGCATCGAGTGCCAG
GCCAACCAGGCCAGCGCCACCAGCGAGGAGTGACCCGTCGCATGGGGTGT
CTGTAATCATGCTTTCCACTTCCACTGCATCAGCAGGTGGCTCAAGACTC
GCCAAGTGTGCCCCTAGACAACAGCGAATGGGAGTTCAGAAATACGGC
CACTAGACCACCCTCCTCCGCCGCTGGCGGGCGGCATGTTACTTGCCTACT
ACCACCCACCAGAAGCCCAGGCCTATCTTGTGCGAACGTCGCTATCTC
CAGCTACTTTAGAACATTTGCATCTACATCTCTGTGTTTATGAGTTTGT
ATAAAGGATTCATGTACTTGCACATCTAATGCTATCGTATCGTATTAAGG
GATTCCCCCATTAATTTACCCGTGCTGTGGACCTGTGGTCGGTACCTTT
TTTGAGCTTCTGGGATAAGGAATATCGCCTTGGGAATGCTGTCCCGGGC
CGGTTATCTTTTTGAGTAAAAAAAAAAAA

Annexe 12 : Alignement des clones Contig2 de Rbx

CRBX6302-S :	-----*	20	-----*	40	-----*	60	-----*	80	-----*	:	-
CRBX6303-S :	-----									:	-
CRBX6301-S :	-----									:	-
CRBX4921-S :	-----									:	-
CRBX4921-T :	-----									:	-
CRBX4922-S :	-----									:	-
CRBX4922-T :	-----									:	-
CRBX4923-T :	-----									:	-
CRBX4923-S :	-----									:	-
CONTIG :	CCACGCGCTCGCGGACGCGGGGGCGGACGCGGGGGTCCGGTCTCCCGTCTCGCCCTAGCCCTCCTCCTGCCCTCCGCTCGCCCTAGGGTTCGCT									:	90
CRBX6301-T :	GGTCTCCCGTCTCGCCCTAGCCCTCCTCCTGCCCTCCGCTCGCCCTAGGGTTCGCT									:	53
CRBX6303-T :	GGTCTCCCGTCTCGCCCTAGCCCTCCTCCTGCCCTCCGCTCGCCCTAGGGTTCGCT									:	53
CRBX6302-T :	GGTCTCCCGTCTCGCCCTAGCCCTCCTCCTGCCCTCCGCTCGCCCTAGGGTTCGCT									:	53
CRBX6302-S :	-----100-----*	120	-----*	140	-----*	160	-----*	180	-----*	:	68
CRBX6303-S :	-----									:	63
CRBX6301-S :	-----									:	65
CRBX4921-S :	-----									:	5
CRBX4921-T :	-----									:	5
CRBX4922-S :	-----									:	5
CRBX4922-T :	-----									:	5
CRBX4923-T :	-----									:	5
CRBX4923-S :	-----									:	5
CONTIG :	CGCGATGGACGAGGGCGACGTCGCGGTGGCCGTGCCCCCGCCGCCCTCTCTCTCTGCGCGCGCGCGGCTGCAAGAAGGGGAAGCG									:	180
CRBX6301-T :	CGCGATGGACGAGGGCGACGTCGCGGTGGCCGTGCCCCCGCCGCCCTCTCTCTCTGCGCGCGCGCGGCTGCAAGAAGGGGAAGCG									:	143
CRBX6303-T :	CGCGATGGACGAGGGCGACGTCGCGGTGGCCGTGCCCCCGCCGCCCTCTCTCTCTGCGCGCGCGCGGCTGCAAGAAGGGGAAGCG									:	143
CRBX6302-T :	CGCGATGGACGAGGGCGACGTCGCGGTGGCCGTGCCCCCGCCGCCCTCTCTCTCTGCGCGCGCGCGGCTGCAAGAAGGGGAAGCG									:	143
CRBX6302-S :	-----200-----*	220	-----*	240	-----*	260	-----*	:	158		
CRBX6303-S :	-----							:	153		
CRBX6301-S :	-----							:	155		
CRBX4921-S :	-----							:	95		
CRBX4921-T :	-----							:	95		
CRBX4922-S :	-----							:	95		
CRBX4922-T :	-----							:	95		
CRBX4923-T :	-----							:	95		
CRBX4923-S :	-----							:	95		
CONTIG :	CTTCGAGATCAAAAAGTGGAAACGCCGTGCGCGCTCTGGGCTTGGGAATCTGGGTTCGACAACCTGCGCCATCTGCCGCAATCACATCATGGA							:	270		
CRBX6301-T :	CTTCGAGATCAAAAAGTGGAAACGCCGTGCGCGCTCTGGGCTTGGGAATCTGGGTTCGACAACCTGCGCCATCTGCCGCAATCACATCATGGA							:	233		
CRBX6303-T :	CTTCGAGATCAAAAAGTGGAAACGCCGTGCGCGCTCTGGGCTTGGGAATCTGGGTTCGACAACCTGCGCCATCTGCCGCAATCACATCATGGA							:	233		
CRBX6302-T :	CTTCGAGATCAAAAAGTGGAAACGCCGTGCGCGCTCTGGGCTTGGGAATCTGGGTTCGACAACCTGCGCCATCTGCCGCAATCACATCATGGA							:	233		
CRBX6302-S :	-----280-----*	300	-----*	320	-----*	340	-----*	360	-----*	:	248
CRBX6303-S :	-----									:	243
CRBX6301-S :	-----									:	245
CRBX4921-S :	-----									:	185
CRBX4921-T :	-----									:	185
CRBX4922-S :	-----									:	185
CRBX4922-T :	-----									:	185
CRBX4923-T :	-----									:	185
CRBX4923-S :	-----									:	185
CONTIG :	CCCTGCGATCGAGTGCCAGGCGAACCAGGCCAGCGCCACAGCGAGGAGTGACACCGTCTGGTGGGAGTTTGCAACCATGCAATTCACATT							:	323		
CRBX6301-T :	CCCTGCGATCGAGTGCCAGGCGAACCAGGCCAGCGCCACAGCGAGGAGTGACACCGTCTGGTGGGAGTTTGCAACCATGCAATTCACATT							:	323		
CRBX6303-T :	CCCTGCGATCGAGTGCCAGGCGAACCAGGCCAGCGCCACAGCGAGGAGTGACACCGTCTGGTGGGAGTTTGCAACCATGCAATTCACATT							:	323		
CRBX6302-T :	CCCTGCGATCGAGTGCCAGGCGAACCAGGCCAGCGCCACAGCGAGGAGTGACACCGTCTGGTGGGAGTTTGCAACCATGCAATTCACATT							:	323		
CRBX6302-S :	-----380-----*	400	-----*	420	-----*	440	-----*	:	338		
CRBX6303-S :	-----							:	333		
CRBX6301-S :	-----							:	335		
CRBX4921-S :	-----							:	275		
CRBX4921-T :	-----							:	275		
CRBX4922-S :	-----							:	275		
CRBX4922-T :	-----							:	275		
CRBX4923-T :	-----							:	275		
CRBX4923-S :	-----							:	275		
CONTIG :	CCACTGCGATCAGCCGTTGGCTCAAGACCCGTCAAGTGTGCCCTTAGACACACAGCGAGTGGGAGTTCCAGAAGTATGTTGCTACTAAGACAG							:	413		
CRBX6301-T :	CCACTGCGATCAGCCGTTGGCTCAAGACCCGTCAAGTGTGCCCTTAGACACACAGCGAGTGGGAGTTCCAGAAGTATGTTGCTACTAAGACAG							:	413		
CRBX6303-T :	CCACTGCGATCAGCCGTTGGCTCAAGACCCGTCAAGTGTGCCCTTAGACACACAGCGAGTGGGAGTTCCAGAAGTATGTTGCTACTAAGACAG							:	413		
CRBX6302-T :	CCACTGCGATCAGCCGTTGGCTCAAGACCCGTCAAGTGTGCCCTTAGACACACAGCGAGTGGGAGTTCCAGAAGTATGTTGCTACTAAGACAG							:	413		
CRBX6302-S :	-----460-----*	480	-----*	500	-----*	520	-----*	540	-----*	:	428
CRBX6303-S :	-----									:	423
CRBX6301-S :	-----									:	425
CRBX4921-S :	-----									:	364
CRBX4921-T :	-----									:	364
CRBX4922-S :	-----									:	364
CRBX4922-T :	-----									:	364
CRBX4923-T :	-----									:	364
CRBX4923-S :	-----									:	364
CONTIG :	CTCTGTTTTCTCGAATTGAAGTGTGAATTTGGTGGG-----							:	555		
CRBX6301-T :	CTCTGTTTTCTCGAATTGAAGTGTGAATTTGGTGGG-----						:	552			
CRBX6303-T :	CTCTGTTTTCTCGAATTGAAGTGTGAATTTGGTGGG-----						:	491			
CRBX6302-T :	CTCTGTTTTCTCGAATTGAAGTGTGAATTTGGTGGG-----						:	491			
CRBX6302-S :	-----560-----*	580	-----*	600	-----*	620	-----*	:	518		
CRBX6303-S :	-----							:	518		
CRBX6301-S :	-----							:	518		
CRBX4921-S :	-----							:	454		
CRBX4921-T :	-----							:	454		
CRBX4922-S :	-----							:	454		
CRBX4922-T :	-----							:	454		
CRBX4923-T :	-----							:	454		
CRBX4923-S :	-----							:	454		
CONTIG :	ATGTTCTCTGAGCTTGGATTTTGTATAACCCATGATCCTTTGTGAGTACTGTTTACGCAAAATCGTCCCTGAGAGCTACGATGATGATCT							:	577		
CRBX6301-T :	ATGTTCTCTGAGCTTGGATTTTGTATAACCCATGATCCTTTGTGAGTACTGTTTACGCAAAATCGTCCCTGAGAGCTACGATGATGATCT							:	569		
CRBX6303-T :	ATGTTCTCTGAGCTTGGATTTTGTATAACCCATGATCCTTTGTGAGTACTGTTTACGCAAAATCGTCCCTGAGAGCTACGATGATGATCT							:	578		
CRBX6302-T :	ATGTTCTCTGAGCTTGGATTTTGTATAACCCATGATCCTTTGTGAGTACTGTTTACGCAAAATCGTCCCTGAGAGCTACGATGATGATCT							:	578		
CRBX6302-S :	-----640-----*	660	-----*	:	555						
CRBX6303-S :	-----				550						
CRBX6301-S :	-----				552						
CRBX4921-S :	-----				491						
CRBX4921-T :	-----				491						
CRBX4922-S :	-----				491						
CRBX4922-T :	-----				491						
CRBX4923-T :	-----				491						
CRBX4923-S :	-----				491						
CONTIG :	CTCTGTTTTCTCGAATTGAAGTGTGAATTTGGTGGG-----				671						
CRBX6301-T :	CTCTGTTTTCTCGAATTGAAGTGTGAATTTGGTGGG-----				-						
CRBX6303-T :	CTCTGTTTTCTCGAATTGAAGTGTGAATTTGGTGGG-----				-						
CRBX6302-T :	CTCTGTTTTCTCGAATTGAAGTGTGAATTTGGTGGG-----				-						

Annexe 13 : Séquence de l'Actine de Blé

>séquence complète Actine Blé

TCAACAACTGGGATGACATGGGGAAAATATGGCATCACACGTTCTACAACGAGCTCCGTGTCGCAC
CAGAGGATCATCCTGTGTTGCTGACTGAGGCCCCCTCTCAACCCCAAGGCCAACAGAGAGAAAAATG
ACCCAGATCATGTTCGAAACCTTCAGTTGCCCAGCAATGTATGTCGCAATCCAGGCCGTTCTGTCCT
TGTATGCCAGCGGTCTGAACAACTGGTATTGTGCTCGACTCTGGTGATGGTGTGAGCCACACTGTTC
CAATCTATGAGGGATACACGCTTCCTCATGCTATCCTTCGTTTGGACCTTGCTGGCCGGGACCTCAC
GGATAATCTAATGAAGATCCTGACAGAAAAGAGGGTACTCCCTCACAACAACCGCTGAGCGGGAAA
TTGTCAGAGACATAAAGGAGAAGCTCGCTTACGTGGCCCTTGATTATGAGCAGGAGCTGGAAACG
GCTAGGAGCAGCTCCTCTGTGGAGAAGAGCTATGAGATGCCTGATGGTCAGGTTATAACAATTGGT
TCAGAAAGGTTCAAGGTGCCCTGAGGTGCTGTTCCAGCCATCTCATGTTGGTATGGAAGTTCCTGGT
ATACACGAAGCGACATACAATTCCATCATGAAGTGTGATGTTGATATCAGAAAGGATCTGTATGGT
AATGTTGTTCTCAGTGGAGGTTCTACCATGTTTCCTGGAATTGCTGATCGCATGAGCAAAGAGATC
ACGGCCCTTGCTCCTAGCAGTATGAAGGTTAAAGTTATTGCACCACCTGAAAGGAAATACAGTGTC
TGGATCGGTGGCTCTATTTTGGCCTCTCTTAGCACTTTCCAGCAGATGTGGATCTCCAAGGCGGAGT
ACGATGAGTCTGGTCCCGGCATTGTCCACATGAAGTGCTTTTGAAGAGTCGGTGAAGGGGACTTAC
AAAGGGGACTTGCTGCCAAGAATATATAGTACATGGAGTACATGGTTAGTGTTCTGTAGAAGATGT
GTACCCTCAGAGGAATAAGGGGTACAGGAAAATCAGTCTCGGTTTCAGCTTTTCCTTTTGGCACAAT
TGCATGGCCTTGTCATGGTGTGCTGCTGTATGAAATAATGAAATGGGACATATGTGTATGCCTA
AGCGACATTGTGTGGTACGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Annexe 14 : Alignement des clones Actine (F : Feuille, R : Racine, E : Epi)

		*	500	*	520	*	540	*	560	
E4323-SP6 :	-----									-
F4324-SP6 :	-----									-
R4323-SP6 :	-----									-
E4321-SP6 :	-----									-
seq :	TTGAGAAGAGCTATGAGATGCCTGATGGTCAGGTTATAACAATTGGTTCAGAAAGGTTCAAGTGCCTGAGGTGCTGTTTC									560
R4324-SP6 :	-----									-
F4323-SP6 :	-----									-
		*	580	*	600	*	620	*	640	
E4323-SP6 :	-----									41
F4324-SP6 :	-----									41
R4323-SP6 :	-----									41
E4321-SP6 :	-----									41
seq :	CAGCCATCTCATGTTGGTATGGAAGTTCCTGGTATACAC									640
R4324-SP6 :	-----									41
F4323-SP6 :	-----									41
		*	660	*	680	*	700	*	720	
E4323-SP6 :	CAGAAAGCATCTGATGGTAATGTTGTTCTCAGTGGAGGTTCTACCATGTTTCCTGGAATTGCTGATCGCATGAGCAAG									121
F4324-SP6 :	CAGAAAGCATCTGATGGTAATGTTGTTCTCAGTGGAGGTTCTACCATGTTTCCTGGAATTGCTGATCGCATGAGCAAG									121
R4323-SP6 :	CAGAAAGCATCTGATGGTAATGTTGTTCTCAGTGGAGGTTCTACCATGTTTCCTGGAATTGCTGATCGCATGAGCAAG									121
E4321-SP6 :	CAGAAAGCATCTGATGGTAATGTTGTTCTCAGTGGAGGTTCTACCATGTTTCCTGGAATTGCTGATCGCATGAGCAAG									121
seq :	CAGAAAGCATCTGATGGTAATGTTGTTCTCAGTGGAGGTTCTACCATGTTTCCTGGAATTGCTGATCGCATGAGCAAG									720
R4324-SP6 :	CAGAAAGCATCTGATGGTAATGTTGTTCTCAGTGGAGGTTCTACCATGTTTCCTGGAATTGCTGATCGCATGAGCAAG									121
F4323-SP6 :	CAGAAAGCATCTGATGGTAATGTTGTTCTCAGTGGAGGTTCTACCATGTTTCCTGGAATTGCTGATCGCATGAGCAAG									121
		*	740	*	760	*	780	*	800	
E4323-SP6 :	AGATCACGGCCCTTGCTCCTAGCAGIATGAAGGTTAAAGTTATTGCACCACCTGAAAGGAAATACAGTGTCTGGATCGGT									201
F4324-SP6 :	AGATCACGGCCCTTGCTCCTAGCAGIATGAAGGTTAAAGTTATTGCACCACCTGAAAGGAAATACAGTGTCTGGATCGGT									201
R4323-SP6 :	AGATCACGGCCCTTGCTCCTAGCAGIATGAAGGTTAAAGTTATTGCACCACCTGAAAGGAAATACAGTGTCTGGATCGGT									201
E4321-SP6 :	AGATCACGGCCCTTGCTCCTAGCAGIATGAAGGTTAAAGTTATTGCACCACCTGAAAGGAAATACAGTGTCTGGATCGGT									201
seq :	AGATCACGGCCCTTGCTCCTAGCAGIATGAAGGTTAAAGTTATTGCACCACCTGAAAGGAAATACAGTGTCTGGATCGGT									800
R4324-SP6 :	AGATCACGGCCCTTGCTCCTAGCAGIATGAAGGTTAAAGTTATTGCACCACCTGAAAGGAAATACAGTGTCTGGATCGGT									201
F4323-SP6 :	AGATCACGGCCCTTGCTCCTAGCAGIATGAAGGTTAAAGTTATTGCACCACCTGAAAGGAAATACAGTGTCTGGATCGGT									201
		*	820	*	840	*	860	*	880	
E4323-SP6 :	GGCTCTATTTTGGCCTCTCTTAGCACTTTCCAGCAGATGTGGATCTCCAAGGCGAGTACGACAGTCTGGTCCCGGCAT									281
F4324-SP6 :	GGCTCTATTTTGGCCTCTCTTAGCACTTTCCAGCAGATGTGGATCTCCAAGGCGAGTACGACAGTCTGGTCCCGGCAT									281
R4323-SP6 :	GGCTCTATTTTGGCCTCTCTTAGCACTTTCCAGCAGATGTGGATCTCCAAGGCGAGTACGACAGTCTGGTCCCGGCAT									281
E4321-SP6 :	GGCTCTATTTTGGCCTCTCTTAGCACTTTCCAGCAGATGTGGATCTCCAAGGCGAGTACGACAGTCTGGTCCCGGCAT									281
seq :	GGCTCTATTTTGGCCTCTCTTAGCACTTTCCAGCAGATGTGGATCTCCAAGGCGAGTACGACAGTCTGGTCCCGGCAT									880
R4324-SP6 :	GGCTCTATTTTGGCCTCTCTTAGCACTTTCCAGCAGATGTGGATCTCCAAGGCGAGTACGACAGTCTGGTCCCGGCAT									281
F4323-SP6 :	GGCTCTATTTTGGCCTCTCTTAGCACTTTCCAGCAGATGTGGATCTCCAAGGCGAGTACGACAGTCTGGTCCCGGCAT									281
		*	900	*	920	*	940	*	960	
E4323-SP6 :	TGTCCACATGAAGTGCTTCTGAAGAGTCGGCGAAGGTTGTTTACAAAGGGGACTTGCTGCCAAGAAATATATAGTAGTAC									361
F4324-SP6 :	TGTCCACATGAAGTGCTTCTGAAGAGTCGGCGAAGGTTGTTTACAAAGGGGACTTGCTGCCAAGAAATATATAGTAGTAC									361
R4323-SP6 :	TGTCCACATGAAGTGCTTCTGAAGAGTCGGCGAAGGTTGTTTACAAAGGGGACTTGCTGCCAAGAAATATATAGTAGTAC									361
E4321-SP6 :	TGTCCACATGAAGTGCTTCTGAAGAGTCGGCGAAGGTTGTTTACAAAGGGGACTTGCTGCCAAGAAATATATAGTAGTAC									361
seq :	TGTCCACATGAAGTGCTTCTGAAGAGTCGGCGAAGGTTGTTTACAAAGGGGACTTGCTGCCAAGAAATATATAGTAGTAC									958
R4324-SP6 :	TGTCCACATGAAGTGCTTCTGAAGAGTCGGCGAAGGTTGTTTACAAAGGGGACTTGCTGCCAAGAAATATATAGTAGTAC									360
F4323-SP6 :	TGTCCACATGAAGTGCTTCTGAAGAGTCGGCGAAGGTTGTTTACAAAGGGGACTTGCTGCCAAGAAATATATAGTAGTAC									360
		*	980	*	1000	*	1020	*	1040	
E4323-SP6 :	ATGGTACATGGTTAGTGTCTGTGAAGATGTGTACCCCTCAGAGGAATAAGGGGTACAGGAAAAATCAGTCTCG-----									434
F4324-SP6 :	ATGGTACATGGTTAGTGTCTGTGAAGATGTGTACCCCTCAGAGGAATAAGGGGTACAGGAAAAATCAGTCTCG-----									434
R4323-SP6 :	ATGGTACATGGTTAGTGTCTGTGAAGATGTGTACCCCTCAGAGGAATAAGGGGTACAGGAAAAATCAGTCTCG-----									434
E4321-SP6 :	ATGGTACATGGTTAGTGTCTGTGAAGATGTGTACCCCTCAGAGGAATAAGGGGTACAGGAAAAATCAGTCTCG-----									434
seq :	GGAGTACATGGTTAGTGTCTGTGAAGATGTGTACCCCTCAGAGGAATAAGGGGTACAGGAAAAATCAGTCTCGTTTCAGC									1038
R4324-SP6 :	ATGGTACATGGTTAGTGTCTGTGAAGATGTGTACCCCTCAGAGGAATAAGGGGTACAGGAAAAATCAGTCTCG-----									433
F4323-SP6 :	ATGGTACATGGTTAGTGTCTGTGAAGATGTGTACCCCTCAGAGGAATAAGGGGTACAGGAAAAATCAGTCTCG-----									433
		*	1060	*	1080	*	1100	*	1120	
E4323-SP6 :	-----									-
F4324-SP6 :	-----									-
R4323-SP6 :	-----									-
E4321-SP6 :	-----									-
seq :	TTTTCTTTTGGCACAATTGCATGGCCTTGCAATGGTGCTTGCTGCTGTATGAAATAATGAAATGGGACATATGTGTATG									1118
R4324-SP6 :	-----									-
F4323-SP6 :	-----									-
		*	1140	*	1160					
E4323-SP6 :	-----									-
F4324-SP6 :	-----									-
R4323-SP6 :	-----									-
E4321-SP6 :	-----									-
seq :	CCTAAGCCACATTGTGTGGTACGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA									1163
R4324-SP6 :	-----									-
F4323-SP6 :	-----									-

Annexe 15 : Dosage des ARN totaux

Tableau de résultats du dosage des ARN totaux

	DO (nm)			PURETE (ratios)		[ARNtx]
	230	260	280	260/280	260/230	µg/µL
TO	0,03	0,038	0,021	1,81	1,27	1,52
T30	0,008	0,012	0,007	1,71	1,50	0,48
T2	0,008	0,015	0,009	1,67	1,88	0,60
T6	0,005	0,008	0,005	1,60	1,60	0,32
T12	0,014	0,02	0,012	1,67	1,43	0,80
T24	0,01	0,023	0,013	1,77	2,30	0,92
H30	0,026	0,04	0,023	1,74	1,54	1,60
H2	0,011	0,022	0,012	1,83	2,00	0,88
H6	0,018	0,035	0,019	1,84	1,94	1,40
H12	0,017	0,039	0,023	1,70	2,29	1,56
H24	0,018	0,036	0,02	1,80	2,00	1,44

	DO			PURETE (ratios)		[ARNtx]
	230	260	280	260/280	260/230	µg/µL
TO	0,02	0,031	0,024	1,29	1,55	1,24
T2	0,009	0,018	0,011	1,64	2,00	0,72
T6	0,006	0,01	0,006	1,67	1,67	0,40
T10	0,016	0,033	0,019	1,74	2,06	1,32
T24	0,01	0,021	0,013	1,62	2,10	0,84
T48	0,01	0,019	0,011	1,73	1,90	0,76
H0	0,022	0,051	0,03	1,70	2,32	2,04
H2	0,018	0,04	0,024	1,67	2,22	1,60
H6	0,02	0,045	0,027	1,67	2,25	1,80
H10	0,027	0,064	0,036	1,78	2,37	2,56
H24	0,034	0,068	0,038	1,79	2,00	2,72
H48	0,021	0,048	0,027	1,78	2,29	1,92

Annexe 16 : Séquences nucléotidique de 13 TSKs

>Tsk1 [Triticum aestivum; TC147344; CK161460, CD938805, BG904381]
ATGGCGGCCGCGGGAGACGCCGCGGAGAAGAAGATGGTGACGCTCAAGAGCTCGGACGGGGAGG
AGTTCGAGGTGGAGGAGGCGGTGCGCATGGAGTCGCAGACCATCCGCCACATGATCGAGGACGAC
TGCGCCGACAACGGCATCCCGCTCCGGAGGGGGGGCTCCATGATCCTCTCCAAGGTCATCGAGTAC
TGCAACAAGCACGTCCAGGCCAAGCCCGCCGACGCCGCCGCCGCGGGGCCGCCGCGCCCGACGC
GGCGGCGCCCCCGCCGAGGACCTCAAGAACTGGGACGCCGAGTTCGTCAAGGTCGACCAGGCCA
CCCTCTTCGACCTCATCCTGGCCGCAAACCTTCCTTAACATCAAGGGGCTGCTGGACCTGACCTGCCA
GACTGTTGCGGACATGATCAAGGGCAAGACCCCGGAGGAGATCCGCAAGACCTTCAACATCAAGA
ACGACTTCCCGCCCCGAGGAGGAGGAGGAGATCCGCACGGAGAACCAGTGGGCCTTTGAGTAG

>Tsk3 [Triticum aestivum; TC147339; AY316293, BQ744294, CD895302, CD895303]
ATGGCGGCCGCGGGAGACGCCGCGGAGAAGAAGATGATCACACTCAAGAGCTCGGACGGCGAGG
AGTTCGAGGTGGAGGAGGCGGTGGCCATGGAGTCGCAGACGATCCGCCACATGATCGAGGACGAC
TGCGCCGACAACGGCATCCCGCTCCCCAACGTCAACTCCAAGATCCTCTCCAAGGTCATCGAGTAC
TGCAACAAGCACGTCCAGGCCAAGCCCGCCGATGGGGCTGCCGCCGAGCCGGAGCCGGAGCCTC
GGACGCCGCCCCCGCCGCCCCCGCCGAGGACCTCAAGAACTGGGACGCCGAGTTCGTCAAGGTCG
ACCAGGCCACCCTCTTCGACCTCATCCTGGCTGCCAACTACCTGAACATCAAGGGGCTGCTGGACC
TGACCTGCCAGACTGTTGCTGACATGATCAAGGGCAAGACCCCGAGGAGATCCGCAAGACCTTC
AACATCAAGAACGACTTTACGCCCCGAGGAGGAGGAGGAGATCCGCAGGGAGAACCAGTGGGCCTT
TGAGTAG

>Tsk4 [Triticum aestivum; TC147337; CK216851, BQ841943, CD930776]
ATGGCGGCCGCGGGAGACGCCGCGGAGAAGAAGATGATCACGCTCAAGAGCTCGGACGGCGAGG
AGTTCGAGGTGGAGGAGGCGGTGGCCATGGAGTCGCAGACGATCCGCCACATGATCGAGGACGAC
TGCGCCGACAACGGCATCCCGCTCCCCAACGTCAACTCCAAGATCCTCTCCAAGGTCATCGAGTAC
TGCAACAAGCACGTCCAGGCCAAGCCCGCCGACGGGGCCGCGGCCGCCGCCGAGCCTCGGACGC
CGCCGCCCCCGCCGCCCCCGCCGAGGACCTCAAGAACTGGGACGCCGAGTTCGTCAAGGTCGACC
AGGCCACCCTCTTCGACCTCATCCTGGCTGCCAACTACCTGAACATCAAGGGGCTTTTGGACCTAA
CCTGTCAGACTGTTGCCGACATGATCAAGGGCAAGACCCCGGAGGAGATCCGCAAGACCTTCAAC
ATCAAGAACGACTTTACGCCCCGAGGAGGAGGAGGAGATCCGCAGGGAGAACCAGTGGGCCTTTGA
GTAG

>Tsk5 [Triticum aestivum; TC147342; BQ806284, CK194516, CK194212]
ATGGCGGCCGCGGGAGACGCCGCGGAGAAGAAGATGATCACGCTCAAGAGCTCCGACGGCGAGG
AGTTCGAGGTGGAGGAGGCGGTGGCCATGGAGTCGCAGACCATCCGCCACATGATCGAGGACGAC
TGCGCCGACAACGGCATCCCGCTCCCCAACGTCAACTCCAAGATCCTCTCCAAGGTCATCGAGTAC
TGCAACAAGCACGTCCAGGCCAAGCCCGCCGACGGGGCCGCGGCCGCCGCCGAGCCTCGGACGC
CTCCGCCGCCGCCCCCGCCGCCCCCGCCGAGGACCTCAAGAACTGGGACGCCGAGTTCGTCAAGGT
CGACCAGGCCACCCTCTTCGACCTCATCCTGGCTGCCAACTACCTCAACATCAAGGGGCTGCTGGA
CCTGACCTGCCAGACTGTTGCCGACATGATCAAGGGCAAGACCCCGAGGAGATCCGCAAGACCTT
TCAACATCAAGAATGACTTCACCCCCGAGGAGGAGGAGGAGATCCGCAGGGAGAACCAGTGGGCC
TTTGAGTAA

>Tsk6 [Triticum aestivum; TC143188; BJ210897, BJ218256, CD931679, CD931680]
ATGGCGGCCGACGCGGCATCGGCGGCGGTGAAGAAGCTCACGCTCAAGAGCTCCGACGGCGAGGA
CTTCGAGGTGGAGGTGGCGGTGGCGATGGCGTCGCAGACCATCAAGCACATGGTGGAGGACGGCT
GCGCCGACAACATCATCCCGCTCCCCAACGTCAACGCCAAGATCCTCTCCAAGGTCATCGAGTACT
GCACGCAGCACGCCCCAAGGCAGACGACGCCGCCGCCGACTCCGCCACCGCCGTCAAGCCC
GACGAGGAGAAGCTCAAGGCCTTCGACGCCGAATTCGTCAAGGTCGAGCAGGCGACTCTCTTCGA
CCTCATCCTGGCTGCCAACTACCTGGACATCAAGGGGCTCCTGGACCTGACCTGCCAGACCGTCGC
CGACATGATCAAGGGCAAGACTCCGGAGGAGATCCGCAAGACCTTCAACATCACCAACGACTTCA
CCCCGAGGAGGAGGAGGAAGTGCGGAAGGAGAACCAGTGGGCCTTTGAGTGA

>Tsk7 [Triticum aestivum; TC153866; CD904036, CD904037, CD891668, CD891669]
ATGGCGACCGCAGAGGCAGGTGAGAAGAAGATGATCATGCTCAAGTCGGCCGATGGCGAGGAGTT
CGAGGTGGAGGAGGCAGTCACCATGGAGTCGCAGACCATCCGCCACATGATCGAGGATGACTGCG
CTGACAAAGGCATCCCGATCCCCAACATCAACTCCAAGGTCCTCTCCAAGGTCATCGAGTACTGCA
ACAAACATGTCCTGGCCAAGACAGTCGACGTCTCTAGTGGAGCCACATGTGCTACTGCATCTGACA

CCATGGCTCCCGCCGCCCTAGCCGAGGACCTCAAGATCTGGGACGCAGAATTCATCAATGTCGACC
CTGACACTCTCTTCGACCTCATCAAGGCTGCAAGTTACCTCAACATCAAGGGGTGTTGGACCTGA
CTTGCCAGACTGCTGCAGACATGATTAGTGGCAAACCTCCGGAGGAGATCCGTAATTTCTTCAACA
TCCAGAACGACTACTTGCCAGAGGACGAGGAGAAGATCCGCAGGGAGAACCCGTGGGCATTTAG
TAG

>Tsk10 [Triticum aestivum; BQ245413, BQ242667]
ATGGCGACCCGAGAGGCAGGCAAGAAGATGATCATGCTCAAGTCACCCGACGGCATGGAGTTCTGA
GGTGGAGGAGGCAGTCGCCATGGAGTCGCAGACTATTGCAAAATGATCGAGGATGACTGCGCCG
ACACAGCCATTTTGATCCCCAACATCAACTCCAAGATCCTCTCCAGGGTCATCGAGTACTGCAACA
AACACGTACCGACCACTGGAGCCACCGGTGCCGCTGCGTCTGACACCGTGGCTCCCGCCGCCCTAG
CCGAGGACCTCAAGATTTGGGATGCAGAATTCATCAAGGTCAATCGTGCCACCCGCTTCGACCTCA
TCCAGGCTGCAAGTTACCTCAACATCAAGGGGTGTTGGACCTGACTAGCCAGACGACTATCGACA
CGATTAGTGACAATTCTTTGGAGGAGATCCGTAGTTTCTTGAGCACCAAGAACGACTACTTGCCTG
AGGAGGAGCAGACGATCCGCAGGGAGAACCAGTGGGCATTTAGTAA

>Tsk11 [Triticum aestivum; TC177247; BF200876, BQ166186, BJ315716, BJ312136, BJ304929]
ATGTCTGCCGCCGCCGCTGCAGTGGCGGTGCCGATGAGGCGGAGGCGGAGGCGAAGCCCTCGTC
TTCTTCGGAGGAGGTAAAGGAGCCGGAGCCGGGGACAGAGAAGCAGGAGGAGAAACCCGCCCTG
GTGCTGGTGGCCGAGGACGGCGTGGAGGTGCGCATCGCGGAGCCCGCGGCGCGGATGTCGCAGAT
GCTCCGCCACATGATGGAGGACGGCTGCGTCTGACGGCCGCATCCCAACCGCCAACATCCACTCCGA
CATCCTCGAGATGGTTCGTTGAGTACTGCGAGAAGCACGGGCCGTACTACGACCCCGAGGCCTCTGA
GCGCGACCGGTATCCCTTCCCGCCCTTCCCCATCGAGCTCACCCCTACCGTCTCCTCCATCAAGCCC
GTCACCTACGTCGACCCGGACCCCCACGGTCTCAAGGACTGGGACAACGATTTTCATCTCCCTCGAC
AACTCCACCCTCTTCGAGATCATCCTGGCCGCAAACCTACCTGAACATTGAGGATCTGCTGGACCTG
GGCACCTCGACTGTGGCTGACAAGATGAGGGGGGAAAAAGCCAGAGGAGATCCGTGAAATCTTTGA
GATCGAGAACGACTACACACCAGAGCAGGAGGCGGAAGTCAGGAAGGAGAACGCATGGGCCTTT
GAGGACTAA

>Tsk15 [Triticum aestivum; TA50831_4565]
ATGGCGGCCCGCGGGAGACGCCGGCGAGAAGAAGATGGTGACGCTCAAGAGCTCGGACGGGGAGG
AGTTCGAGGTGGAGGAGGCGGTGGCCATGGAGTCGCAGACCATCCGGCACATGATCGAGGACGAC
TGCGCCGACAACGGCATCCCGCTCCCCAACGTCAACTCCAAGATCCTCTCCAAGGTCATCGAGTAC
TGCAACAAGCACGTCCAGGCCAAGCCCGCCGACGGGGCCGCGGAGGACCTCAAGAACTGGGACGC
CGAGTTCGTCAAGGTGACCAAGGCCACCCTCTTCGACCTCATCCTGGCTGCCAACTACCTGAACAT
CAAGGGGCTTTTGGACCTAACCTGTCAGACTGTTGCCGACATGATCAAGGGCAAGACCCCGGAGG
AGATCCGCAAGACCTTCAACATCAAGAACGACTTTACGCCCAGGAGGAGGAGGAGATCCGCAGG
GAGAACCAGTGGGCCTTTGAGTAG

>Tsk16 [Triticum aestivum;LABORATOIRE]
ATGGCGGCCCGCGGGAGACGCCGGCGAGAAGAAGATGATCACACTCAAGAGCTCGGACGGCGAGG
AGTTCGAGGTGGAGGAGGCGGTGGCCATGGAGTCGCAGACGATCCGCCACATGATCGAGGACGAC
TGCGCCGACAACGGCATCCCGCTCCCCAACGTCAACTCCAAGATCCTCTCCAAGGTCATCGAGTAC
TGCAACAAGCACGTCCAGGCCAAGCCCGCCGAGGACCTCAAGAACTGGGACGCCGAGTTCGTCAA
GGTCGACCAGGCCACCCTCTTCGACCTCATCCTGGCTGCCAACTACCTGAACATCAAGGGGCTGCT
GGACCTGACCTGCCAGACTGTTGCTGACATGATCAAGGGCAAGACCCAGAGGAGATCCGCAAGA
CCTTCAACATCAAGAACGACTTTACGCCCAGGAGGAGGAGGAGATCCGCAGGGAGAACCAGTGG
GCCTTTGAGTAG

>Tsk17 [Triticum aestivum;contig8]
ATGTCTGTCCGTATGGGAGCGAGCGATGGCGGCCGCGGGAGACGCCGGCGAGAAGAAGATGATCA
CGCTCAAGAGCTCGGACGGCGAGGAGTTCGAGGTGGAGGAGGCGGTGGCCATGGAGTCGCAGACG
ATCCGCCACATGATCGAGGACGACTGCGCCGACAACGGCATCCCGCTCCCCAACGTCAACTCCAAG
ATCCTCTCCAAGGTCATCGAGTACTGCAACAAGCACGTCCAGGCCAAGCCCGCCGACGGGGCCGCC
GCGGCCGGAGCCGGAGCCTCGGACGCCGCCGCCGCCGCCGCCGAGAGGACCTCAAGAACTG
GGACGCCGAGTTTCGTCAAGGTGACCAAGGCCACCCTCTTCGACCTCATCCTGGCTGCCAACTACCT
GAACATCAAGGGGCTGCTGGACCTAACCTGTCAAACCTGTTGCCGACATGATCAAGGGCAAGACCC
CGGAGGAGATCCGCAAGACCTTCAACATCAAGAACGACTTTACGCCCAGGAGGAGGAAGAATCG
AGTAA

>Tsk18 [Triticum aestivum;TA52464_4565]

ATGGCGGGCCGCGGGAGACGCCGGCGAGAAGAAGATGGTGACGCTCAAGAGCTCGGACGGGGAGG
AGTTCGAGGTGGAGGAGGCGGTGCGCCATGGAGTCGCAGACCATCCGCCACATGATCGAGGACGAC
TGCGCCGACAACGGCATCCCGCTCCCCAACGTCACCTCCAAGATCCTCTCCAAGGTCATCGAGTAC
TGCAACAAGCACGTCCAGGCCAAGCCCGCCGACGCCGCCGCCGCGGGGCCGCCGCGCCCGACGC
GGCGGCGCCCCCGCCGAGGACCTCAAGAACTGGGACGCCGAGTTCGTCAAGGTCGACCAGGCCA
CCCTCTTCGACCTCATCCTGGCCGCAAACCTTCCTTAACATCAAGGGGCTGCTGGACCTGACCTGCCA
GACTGTTGCAGACATGATCAAGGGCAAGACCCCGGAGGAGATCCGCAAGACCTTCAACATCAAGA
ACGACTTCACCCCCCAGGAGGAGGAGGAGATCCGCAGGGAGAACCAGTGGGCCTTTGAGTAG

>Tsk19 [Triticum aestivum;TC236710]

ATGGCGGGCCGCGGGAGACGCCGGCGAGAAGAAGATGGTGACGCTCAAGAGCTCGGACGGGGAGG
AGTTCGAGGTGGAGGAGGCGGTGCGCCATGGAGTCGCAGACCATCCGCCACATGATCGAGGACGAC
TGCGCCGACAACGGCATCCCGCTCCCCAACGTCACCTCCAAGATCCTCTCCAAGGTCATCGAGTAC
TGCAACAAGCACGTCCAGGCCAAGCCCGCCGACGCCGCCGCCGCGGGGCCGCCGCGCCCGACGC
GGCGGCGCCCCCGCCGAGGACCTCAAGAACTGGGACGCCGAGTTCGTCAAGGTCGACCAGGCCA
CCCTCTTCGACCTCATCCTGGCCGCAAACCTTCCTTAACATCAAGGGGCTGCTGGACCTGACCTGCCA
GACTGTTGCGGACATGATCAAGGGCAAGACCCCGGAGGAGATCCGCAAGACCTTCAACATCAAGA
ACGACTTCACGCCCCGAGGAGGAGGAGGAGATCCGCAGGGAGAACCAGTGGGCCTTTGAGTAG

Annexe 17 : séquences protéiques de 13 TSKs

>Tsk1[Triticum aestivum; TC147344; CK161460, CD938805, BG904381]
MAAAGDAGEKKMVTCLKSSDGEEFEVEEAVAMESQTIRHMIEDDCADNGIPLRRGGSMILSKVIEYCNK
HVQAKPADAAAAGAAAPDAAAPPAEDLKNWDAEFVKVDQATLFDLILAAANFLNIKGLLDLTCQTVAD
MIKGKTPEEIRKTFNIKNDFTPPEEEEEIRTENQWAFE*

>Tsk3[Triticum aestivum; TC147339; AY316293, BQ744294, CD895302, CD895303]
MAAAGDAGEKKMITLCKSSDGEEFEVEEAVAMESQTIRHMIEDDCADNGIPLPNVNSKILSKVIEYCNKH
VQAKPADGAAAGAGAGASDAAPAAPPAEDLKNWDAEFVKVDQATLFDLILAAANYLNKGLLDLTCQTV
ADMIKGKTPEEIRKTFNIKNDFTPPEEEEEIRRENQWAFE*

>Tsk4[Triticum aestivum; TC147337; CK216851, BQ841943, CD930776]
MAAAGDAGEKKMITLCKSSDGEEFEVEEAVAMESQTIRHMIEDDCADNGIPLPNVNSKILSKVIEYCNKH
VQAKPADGAAAAAGASDAAPAAPPAEDLKNWDAEFVKVDQATLFDLILAAANYLNKGLLDLTCQTV
ADMIKGKTPEEIRKTFNIKNDFTPPEEEEEIRRENQWAFE*

>Tsk5[Triticum aestivum; TC147342; BQ806284, CK194516, CK194212]
MAAAGDAGEKKMITLCKSSDGEEFEVEEAVAMESQTIRHMIEDDCADNGIPLPNVNSKILSKVIEYCNKH
VQAKPADGAAAGAGASDASAAAPAAPPAEDLKNWDAEFVKVDQATLFDLILAAANYLNKGLLDLTCQT
VADMIKGKTPEEIRKTFNIKNDFTPPEEEEEIRRENQWAFE*

>Tsk6[Triticum aestivum; TC143188; BJ210897, BJ218256, CD931679, CD931680]
MAADAASAAVKKLTLCKSSDGEDFEVEVAVAMASQTIKHMVEDGCADNIPLPNVTAKILSKVIEYCTQ
HAPKADDAADAAADSATAVKPDEEKLKAFDAEFVKVEQATLFDLILAAANYLDIKGLLDLTCQTVADMIKG
KTPEEIRKTFNITNDFTPPEEEEEVRKENQWAFE*

>Tsk7[Triticum aestivum; TC153866; CD904036, CD904037, CD891668, CD891669]
MATAEAGEKKMIMLKSADGEEFEVEEAVTMESQTIRHMIEDDCADKGIPIPNINSKVLKSKVIEYCNKHV
LAKTVDVSSGATCATASDTMAPAALAEDLKIWDAEFINVDPTLFDLIKAASYLNKGLLDLTCQTAAD
MISGKPPEEIRNFFNIQNDYLPEDDEKIRRENPWAFQ*

>Tsk10[Triticum aestivum; BQ245413, BQ242667]
MATREAGKKMIMLCKSPDGMEFEVEEAVAMESQTIRKMIEDDCADTAILIPNINSKILSRVIEYCNKHVPT
TGATGAAASDTVAPAALAEDLKIWDAEFIKVNRATRFDLIQAASYLNKGLLDLTSQTTIDTISDNSLEEI
RSFLSTKNDYLPPEEQTIRRENQWAFQ*

>Tsk11[Triticum aestivum; TC177247; BF200876, BQ166186, BJ315716, BJ312136, BJ304929]
MSAAAAAVAVPDEAEAEAKPSSSSSEEVKEPEPGTEKQEEKPALVLVAEDGVEVRIAEPAAARMSQMLRH
MMEDGCADGRIPTANIHSIDILEMVVEYCEKHGPYYDPEASERDRYPFPFPIELTPTVSSIKPVITYVDPDP

HGLKDWDNDFISLDNSTLFEILAAANYLNIEDLLDLGTSTVADKMRGKKPEEIREIFEIENDYTPEQAEV
RKENAWAFED*

>Tsk15[Triticum aestivum; TA50831_4565]

MAAAGDAGEKKMVTLKSSDGEEFEVEEAVAMESQTIRHMIEDDCADNGIPLPNVNSKILSKVIEYCNK
HVQAKPADGAAEDLKNWDAEFVKVDQATLFDLILAAANYLNIKGLLDLTCQTVADMIKGKTPEEIRKTF
NIKNDFTPEEEEEIRRENQWAFE*

>Tsk16[Triticum aestivum;LABORATOIRE]

MAAAGDAGEKKMITLKSSDGEEFEVEEAVAMESQTIRHMIEDDCADNGIPLPNVNSKILSKVIEYCNKH
VQAKPAEDLKNWDAEFVKVDQATLFDLILAAANYLNIKGLLDLTCQTVADMIKGKTPEEIRKTFNIKNDFT
PEEEEEIRRENQWAFE

>Tsk17[Triticum aestivum;contig8]

MAAAGDAGEKKMITLKSSDGEEFEVEEAVAMESQTIRHMIEDDCADNGIPLPNVNSKILSKVIEYCNKH
VQAKPADGAAAAGAGASDAAAPAAEDLKNWDAEFVKVDQATLFDLILAAANYLNIKGLLDLTCQTV
ADMIKGKTPEEIRKTFNIKNDFTPEEEEESS

>Tsk18 [Triticum aestivum;Contig10]

MAAAGDAGEKKMVTLKSSDGEEFEVEEAVAMESQTIRHMIEDDCADNGIPLPNVTSKILSKVIEYCNK
HVQAKPADAAAAGAAAPDAAAPPAEDLKNWDAEFVKVDQATLFDLILAAANFLNIKGLLDLTCQTVAD
MIKGKTPEEIRKTFNIKNDFTPQEEEEIRRENQWAFE*

>Tsk19 [Triticum aestivum;TC236710]

MAAAGDAGEKKMVTLKSSDGEEFEVEEAVAMESQTIRHMIEDDCADNGIPLPNVTSKILSKVIEYCNK
HVQAKPADAAAAGAAAPDAAAPPAEDLKNWDAEFVKVDQATLFDLILAAANFLNIKGLLDLTCQTVAD
MIKGKTPEEIRKTFNIKNDFTPEEEEEIRRENQWAFE*

RESUMÉ

Les modifications post-traductionnelles des protéines constituent un niveau crucial de régulation de l'expression des gènes. Parmi elles, la conjugaison peptidique impliquant l'ubiquitine intervient entre autre dans la régulation de la stabilité protéique. La fixation de ce peptide de 76 acides aminés, extrêmement conservé, sous forme de chaîne de polyubiquitine, nécessite l'intervention de trois enzymes (E1, E2 et E3) et constitue un signal de dégradation de la protéine ainsi modifiée. Cette voie de régulation intervient dans de très nombreux processus biologiques. Les complexes SCF sont impliqués dans la voie de protéolyse ciblée. Ils représentent l'une des classes les plus fréquentes d'ubiquitine ligase E3 et ils sont composés de quatre sous-unités (Rbx, Cullin, SKP1, et F-box). La structure et la fonction des complexes SCF, ont été étudiées chez la levure, l'Homme et la plante modèle *A. thaliana*. Cependant, peu de travaux ont été réalisés chez des plantes cultivées, en particulier les céréales, telles que le blé. Cinq gènes codant pour la sous-unité Skp1 (TSK1, TSK3, TSK6, TSK11 et TSK16), cinq gènes codant pour la sous-unité F-box (ZTL, ATFL5, EBF, TIR1 et ABA-T), un gène codant pour la sous-unité Cullin1 et un gène codant pour la protéine RBX du complexe SCF du blé, ont été isolés et clonés. Les différents tests d'interaction entre les quatre sous-unités du complexe SCF ont été réalisés par la méthode du double-hybride dans la levure en utilisant la technologie Gateway. Ces études ont montré que les deux protéines, TSK1 et TSK3, fixent spécifiquement différentes sous-unités F-box. Parallèlement, nous avons montré que la protéine TSK11 représente une structure particulière. Des études d'insertion/délétion sur la protéine TSK11 ont permis d'identifier un nouveau domaine indispensable à l'interaction. Les analyses par PCR semi-quantitative des différents gènes codant pour la sous-unité Skp1, dans trois tissus différents (feuille tige et racine), ont mis en évidence une expression constitutive des gènes TSK3, TSK6 et TSK11. Tandis que les gènes TSK1 et TSK16 sont exprimés préférentiellement dans les racines. Les analyses par PCR semi-quantitative sur des plantules de blé à différents stades de développement, ont mis en évidence une surexpression du gène TSK11 au moment de la floraison. Ce qui suggère que TSK11 est probablement un équivalent fonctionnel d'ASK1 chez *Arabidopsis thaliana*.

Mots clés : ubiquitine Ligase E3, complexe SCF, *Triticum aestivum*, TSKs, F-box, double-hybride dans la levure.

ABSTRACT

The selective degradation of proteins is an important means of regulating gene expression and plays crucial roles in the control of various cellular processes. The Ubiquitin (Ub)–Proteasome System (UPS) is the principal non-lysosomal proteolytic pathway in eukaryotic cells and is required for the degradation of key regulatory proteins. Ubiquitin is a 76-residue protein that can be attached covalently to target proteins through an enzymatic conjugation cascade involving three enzymes denoted, E1, E2 and E3. The SCF complex is a type of ubiquitin-protein ligase (E3) that acts as the specific factor responsible for substrate recognition and ubiquitination. Some polyubiquitinated proteins are then targeted to the 26S proteasome for degradation. The SCF complex consists of four components including SKP1, Cullin1, Rbx1 and a large gene family of F-box proteins. Twenty one SKP1-related genes have been described in the *Arabidopsis* genome and some of these genes have been analyzed genetically. By contrast, little is known about the function and structure of SKP1 homologues in wheat. Some of the *Triticum* SKP1-related protein (TSKs) have been characterized in this study. Five complete sequences of SKP1 (TSK1, TSK3, TSK6, TSK11 and TSK16), five F-box (ZTL, ATFL5, EBF, TIR1 and ABA-T), one Cullin1 and one Rbx, were successfully cloned and biochemically characterized. Yeast two-hybrid analysis showed that TSK1 and TSK3 are capable of interacting with different F-box proteins. Furthermore, TSK11 contains an additional domain that changed its interaction capabilities. *In vitro* analysis using a chimeric protein showed that this additional domain could modify the interaction between a SKP-like protein and two F-box proteins. Expression analyses revealed that TSK1 and TSK16 were expressed predominantly in roots. While, TSK3, TSK6 and TSK11 were expressed in several wheat organs. In addition, the *TSK11* was up-regulated in the leaves at the flowering stage.

Key words: E3 Ligase, SCF complexes, *Triticum aestivum*, TSK, F-box protein, Yeast two-hybrid system.

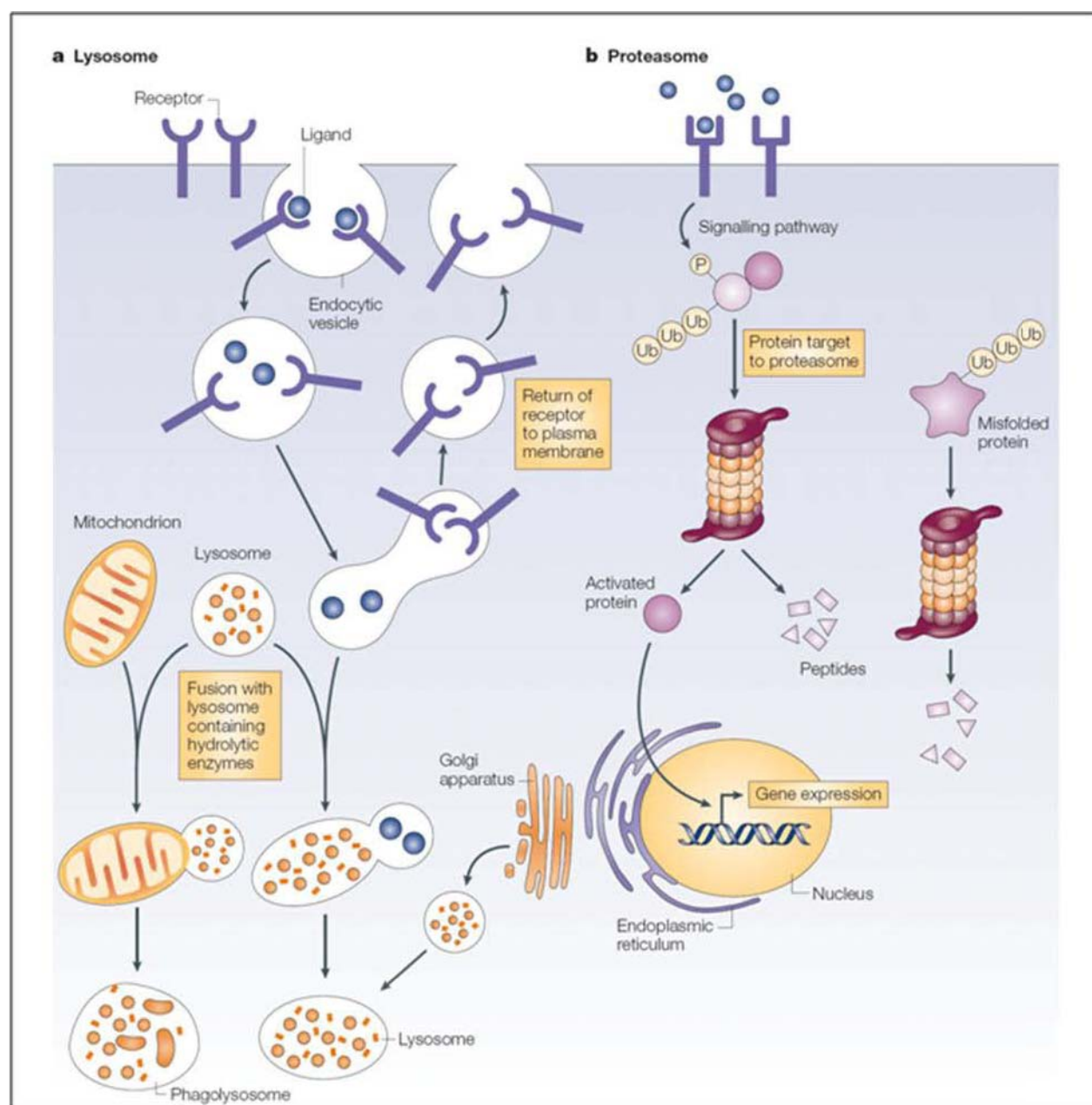


Figure 1 : Présentation des deux principales voies de protéolyse chez les cellules eucaryotes animales (d'après Adams, 2004).

Voie lysosomale (lysosome), par laquelle sont dégradées les protéines extracellulaires et les protéines de surface cellulaire introduites par endocytose.

Voie ubiquitine-protéasome (Protein targeted to proteasome), par laquelle sont dégradées les protéines cytoplasmiques, nucléaires et les protéines provenant du RE (Réticulum endoplasmique).

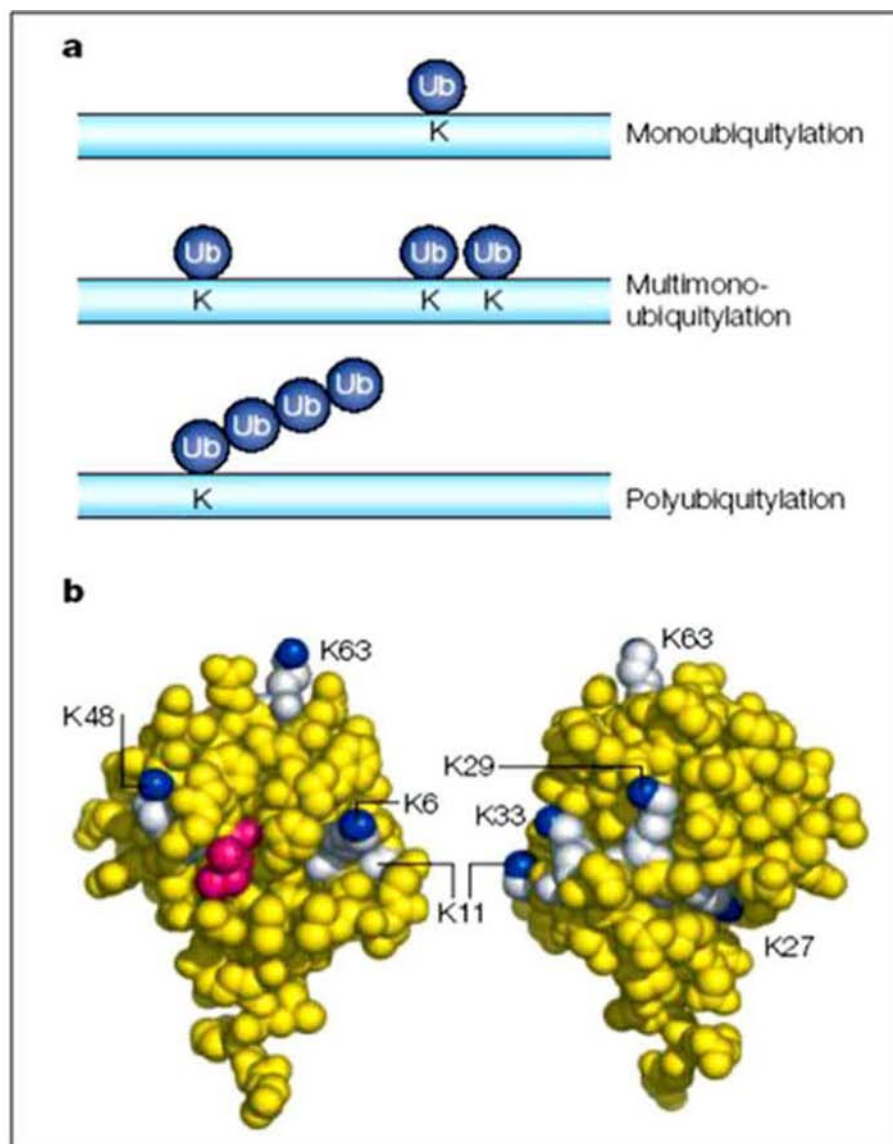


Figure 2 : Représentation schématique de l'ubiquitine et des différentes formes d'ubiquitination de la protéine cible (d'après Hicke et al, 2005).

(a): Trois types de modification impliquant l'ubiquitine : la monoubiquitination au cours de laquelle l'ubiquitine se fixe sur le substrat sur un seul résidu lysine ; la monoubiquitination multiple ou multimonoubiquitination concerne l'ubiquitination du substrat sur différents résidus de lysine et la poly-ubiquitination qui se caractérise par l'ubiquitination du substrat par une chaîne d'ubiquitine. Cette dernière modification, est impliquée principalement dans l'adressage des protéines vers le protéasome pour leur dégradation.

(b): représentation schématique de l'ubiquitine montre les différentes positions des 7 résidus lysine (K49, K63, K6, K11, K33, K29, K63 et K27) (K : résidu lysine).

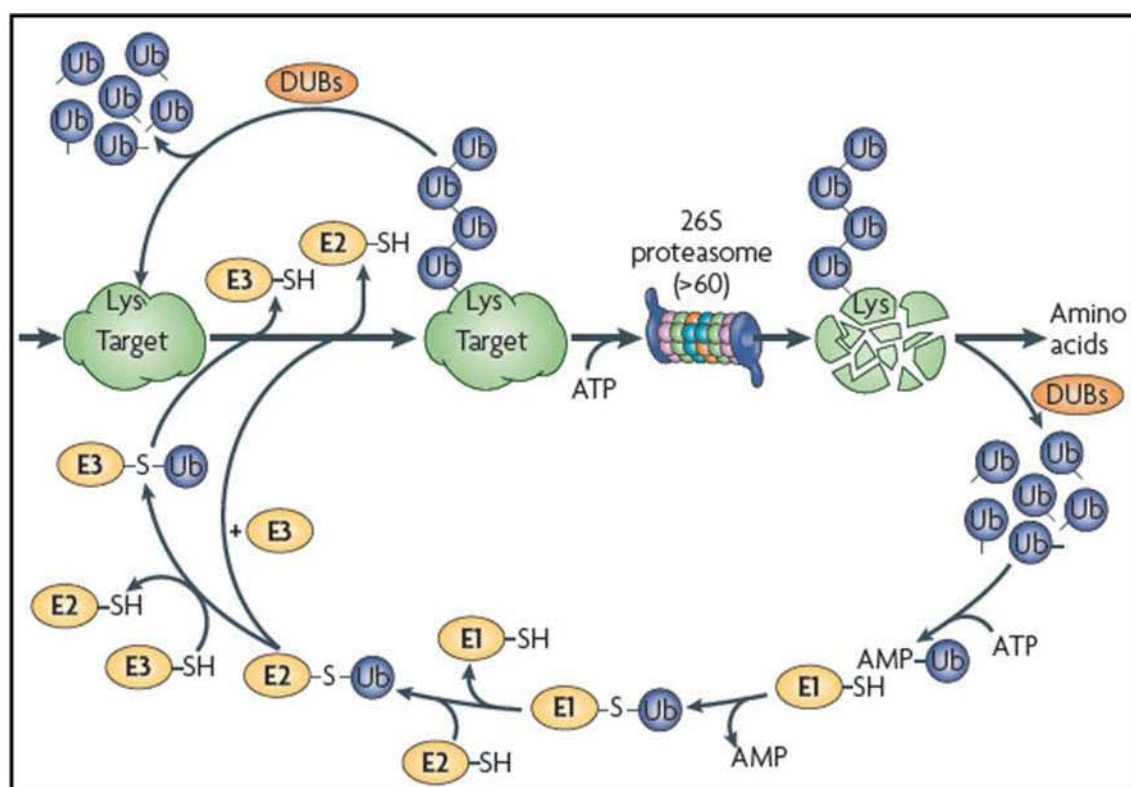


Figure 3 : La voie ubiquitine (Ub) / protéasome 26S (d'après Vierstra, 2009).

La voie commence par l'activation ATP-dépendante de l'ubiquitine par l'enzyme E1, suivie du transfert à l'enzyme E2, puis finalement par la fixation de l'ubiquitine sur la protéine cible (lys Target) avec ou sans l'aide d'une E3. Lorsqu'une protéine porte une chaîne de molécules d'ubiquitine, elle est soit reconnue par le protéasome 26S et dégradée selon un processus ATP-dépendant, soit déubiquitinée par les enzymes de déubiquitination (DUBs), libérant l'ubiquitine et la cible intactes. K (lysine).

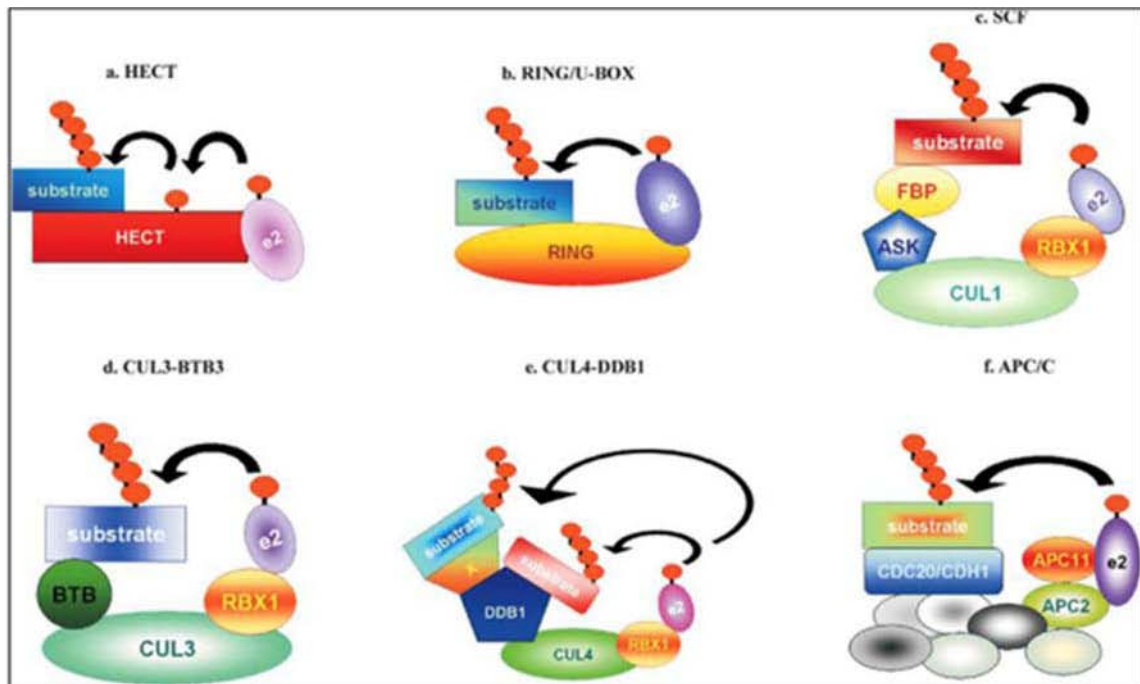


Figure 4 : Structure schématique des différents types E3 ligase (d'après Mazzucotelli et al, 2006).

(a) et (b) représentent les E3 ligases monomériques à domaine HECT (HECT) et à domaine RING (RING/U-box). L'ubiquitine est transférée au substrat avec ou sans l'aide de l'enzyme E3. Cette dernière reconnaît l'acide aminé en position N-terminale de la protéine cible.

(c), (d), (e) et (f) représentent respectivement les enzymes E3 ligase multimérique : les complexes SCF, CUL3-BTB/POZ, CUL4-DDB1 et APC. La particularité de ces complexes est de renfermer des protéines adaptatrices, telles que les protéines F-box (FBP) dans le cas du complexe SCF, qui reconnaissent spécifiquement les protéines cibles.

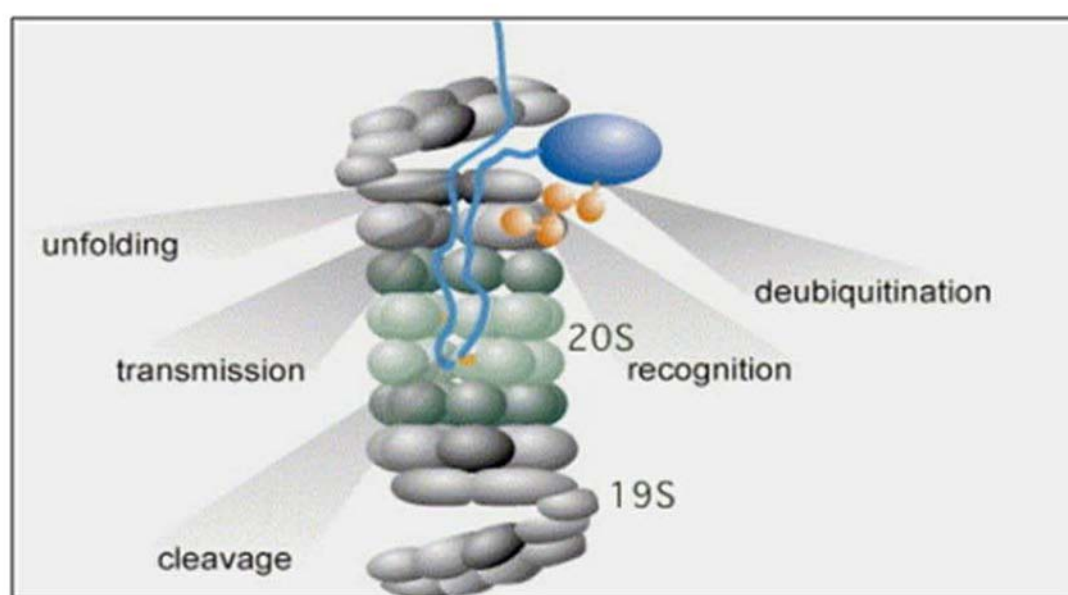
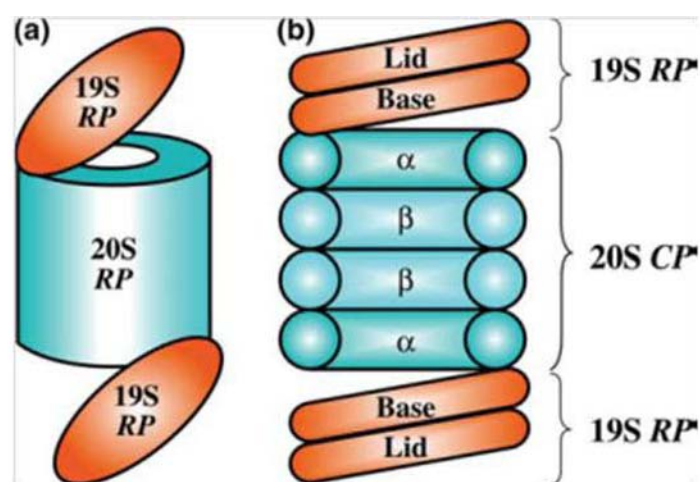


Figure 5 : Représentation schématique du protéasome 26S (d'après Wolf and Hilt, 2004).

(a) l'organisation du protéasome se caractérise par l'association de 2 sous-complexes une particule 20S ou Core Particle (CP), et un complexe régulateur, 19S ou Regulatory Particle (RP).

(b) Le protéasome 26S se caractérise par une architecture complexe constituée de un assemblage en anneaux des différentes sous-unités a et b. À chaque extrémité du complexe 20S on retrouve les sous-particules du complexe 19S : le couvercle (Lid) et la base (Base).

(c) Les substrats du protéasome (en bleu) sont en général reconnus (recognition) via leur chaîne de poly-ubiquitine K48 (en orange) par la particule régulatrice 19S, qui va assurer le dépliement du substrat (unfolding) et sa translocation (transmission) dans la chambre protéolytique du 20S où il sera dégradé. La chaîne de poly-ubiquitine est clivée (cleavage) au cours de ce processus.

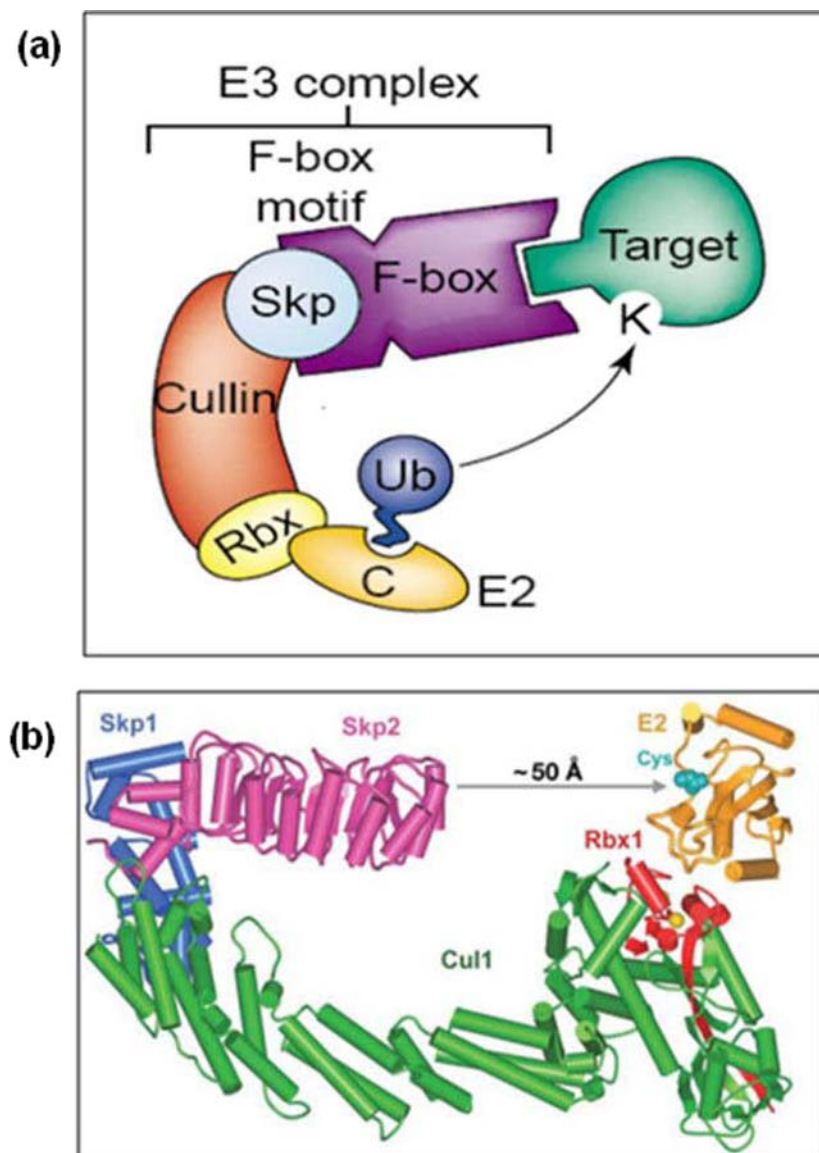


Figure 6 : Organisation et structure des enzymes E3 ligases de type SCF.

(a) Représentation schématique et organisation du complexe SCF. La protéine Cullin1 occupe une position centrale. Elle fixe le complexe Skp1-F-box par son extrémité N-terminale et Rbx1 par son extrémité C-terminale. La protéine F-box reconnaît spécifiquement la protéine cible et catalyse son ubiquitination (d'après Vierstra, 2003).

Ub : ubiquitine, target : protéine cible, K : résidu lysine

(b) Structure cristallographique du complexe SCF humain (d'après Zheng et al, 2002).

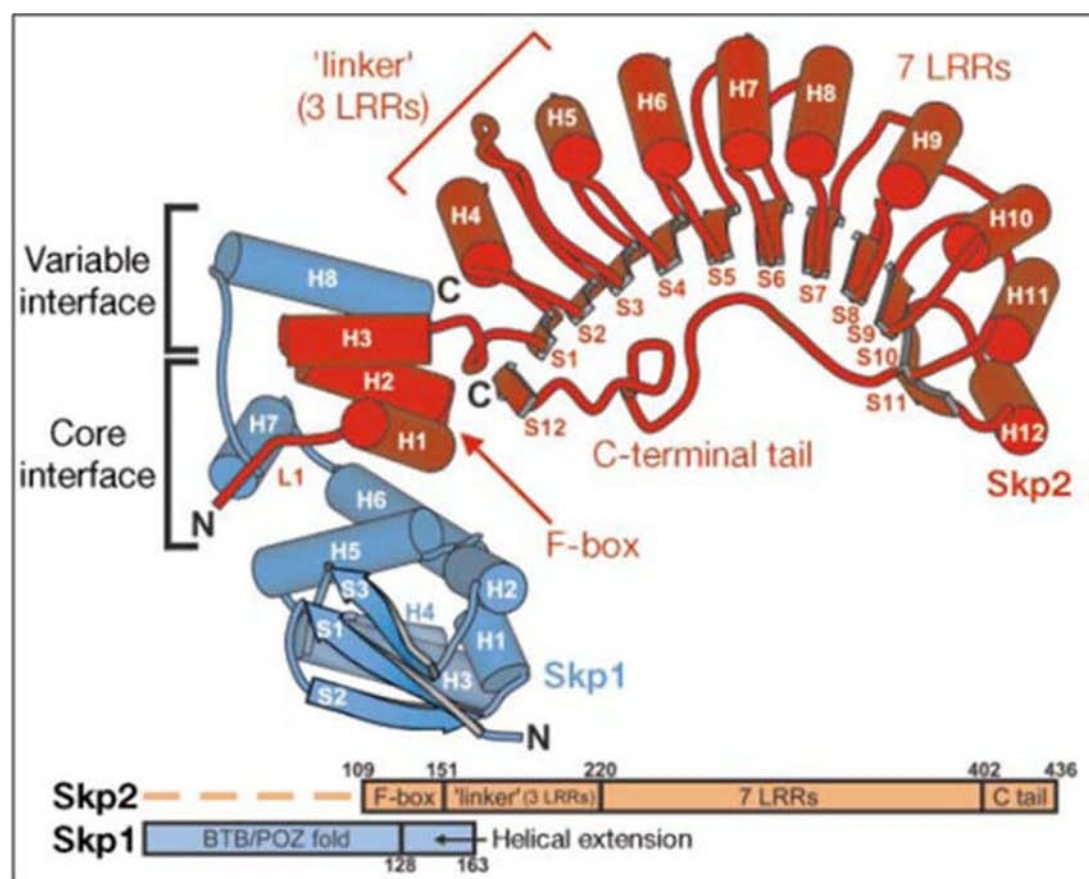


Figure 7 : Structure du complexe Skp1-Skp2 (F-box) humain (d'après Schulman et al, 2000).

Les protéines Skp1 et Skp2 sont représentées respectivement par les couleurs bleu et rouge. La frontière du domaine BTB/POZ (H5, H6) ; l'extrémité C-terminal de la protéine Skp1 (H7, H8) et de la protéine Skp2 ; les 10 résidus LRRs ainsi que la queue de C-terminal de la protéine Skp2 sont schématisés dans le digramme. L'extrémité N-Terminale de la protéine Skp2 est représentée par une ligne discontinue.

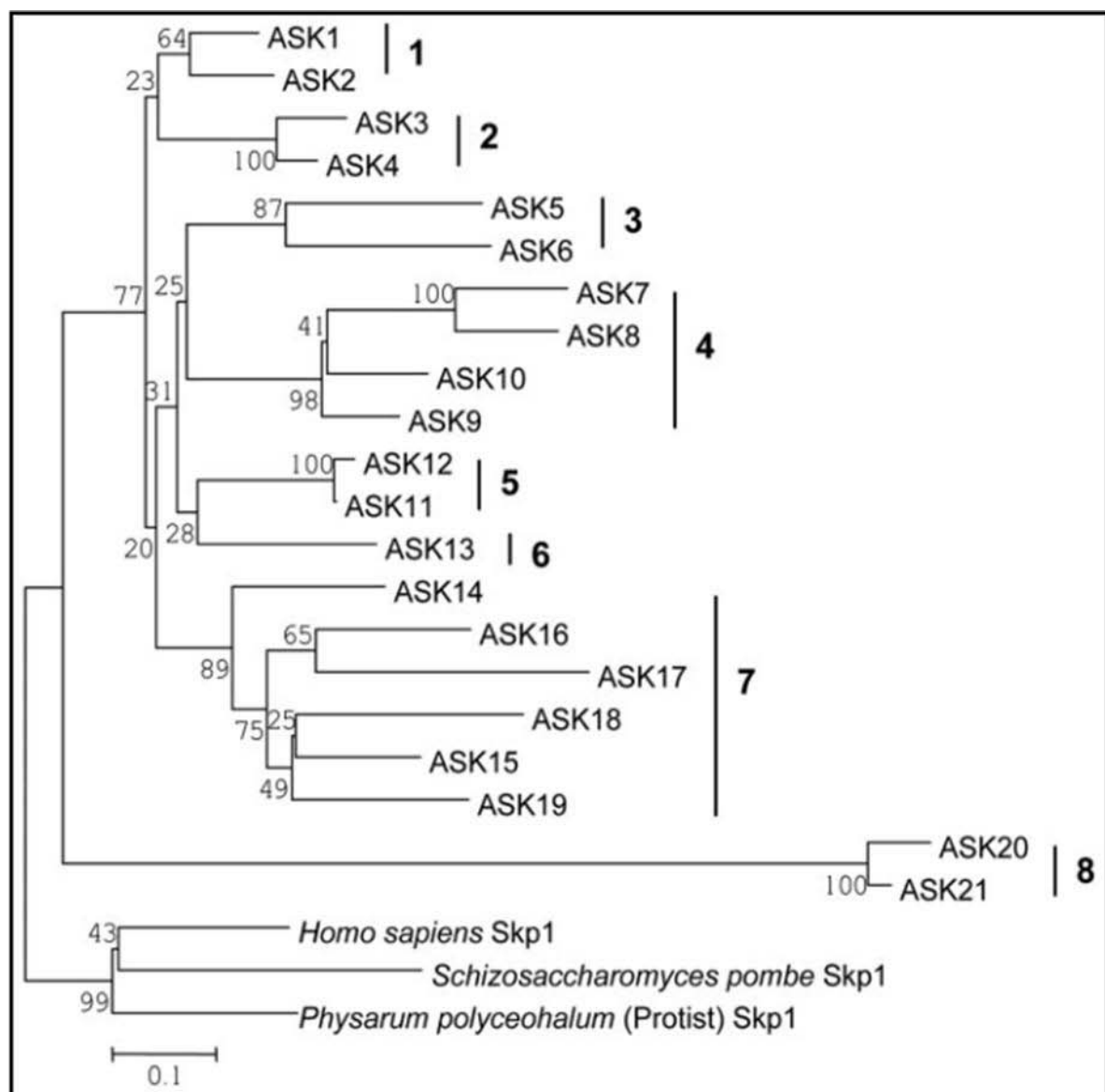


Figure 8 : Organisation de l'arbre phylogénétique des différents gènes ASK chez *Arabidopsis thaliana* en se basant sur leurs séquences en acides aminés (d'après Zhao et al, 2003).

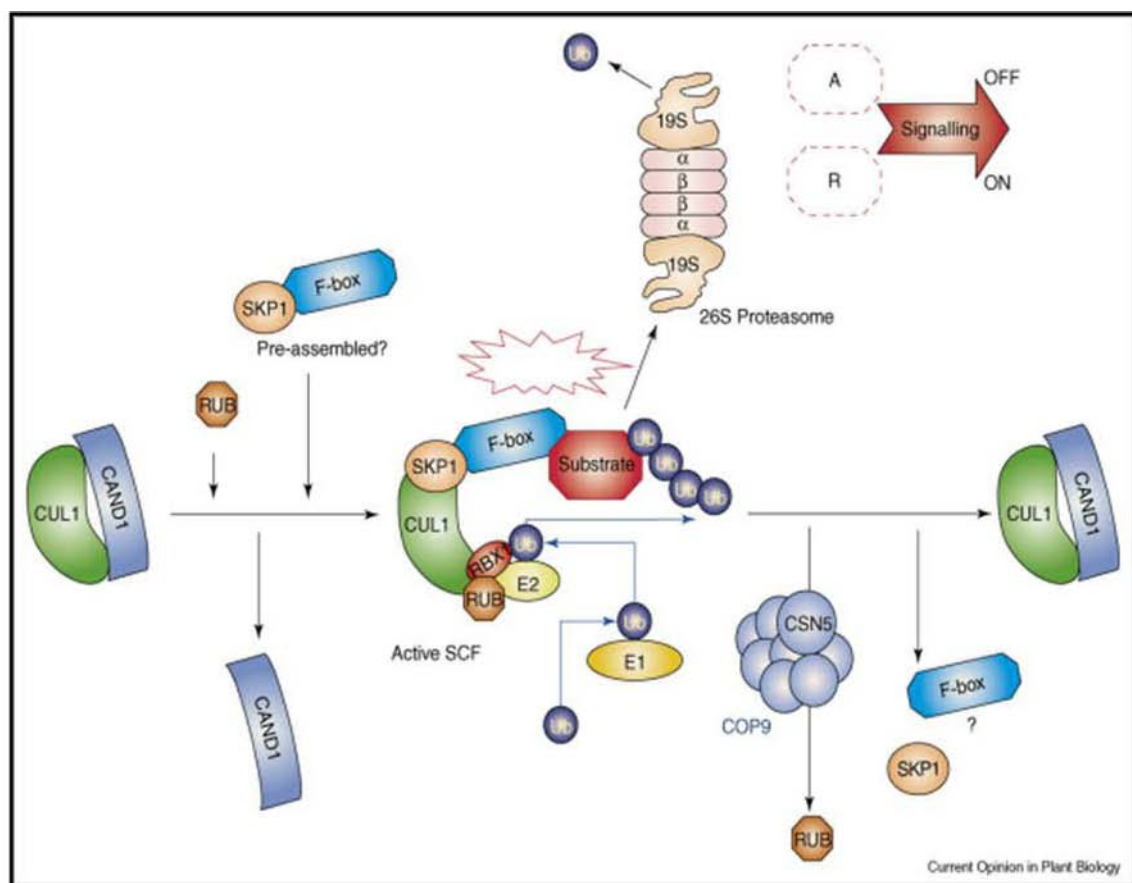


Figure 10 : Assemblage et régulation du complexe SCF (d'après Lechner et al, 2006).

La voie commence par la néddylation de la protéine CUL1 qui permet la libération de la protéine CAND1. La protéine CUL1 devient capable de fixer le complexe SKP1-F-box d'une part et les protéines RBX1 et Rub1 d'autre part. Ensuite l'enzyme E2 est fixé à la protéine RBX1 pour recevoir l'ubiquitine préalablement activée par l'enzyme E1. Finalement l'ubiquitine est transférée directement sur la protéine cible. Lorsqu'un conjugué porte une chaîne de molécules d'ubiquitine, il est reconnu par le protéasome 26S pour être dégradé. La protéine Cop9/CSN, catalyse le clivage de la protéine RUB1/Nedd8 des Cullin et le complexe SCF se décompose. CAND1 va reformer alors une liaison avec la protéine cullin non neddyllée et exclue de ce fait la fixation de Skp1 et la formation du complexe SCF.

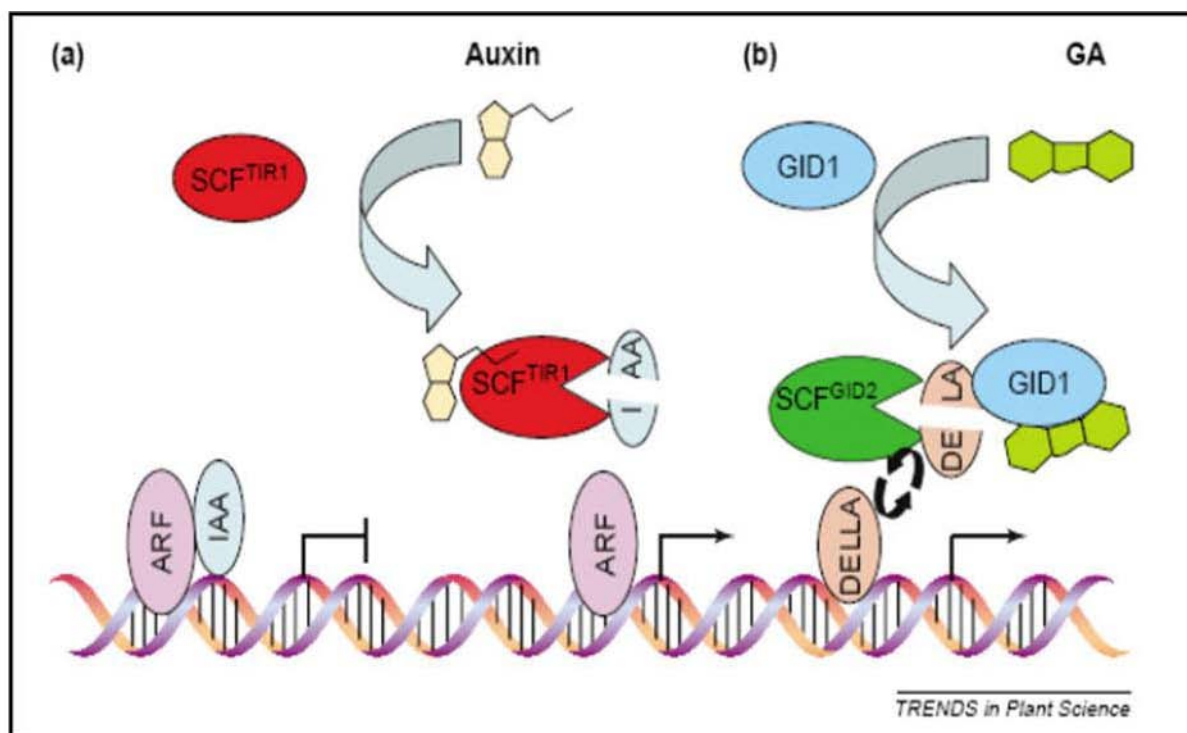


Figure 11 : Dégradation des régulateurs négatifs dans (a) la voie de l'auxine et (b) la voie de l'acide gibbérélique (d'après Huq, 2006).

(a) en absence d'auxine, ou de faible niveau d'auxine, les protéines IAA interagissent avec les protéines ARF pour inhiber l'activation de la transcription. L'auxine induit l'interaction entre TIR1 et les protéines IAA, provoquant la dégradation des protéines IAA par le protéasome 26S.

(b) l'acide gibbérélique (GA) stimule l'interaction physique entre $GID1$ (récepteur de GA) et la protéine DELLA, SLR1, provoquant sa dégradation par la voie SCF^{GID2} /protéasome 26S. Les lignes blanches épaisses barrant les protéines IAA et DELLA en (a) et (b) respectivement, indiquent la dégradation.

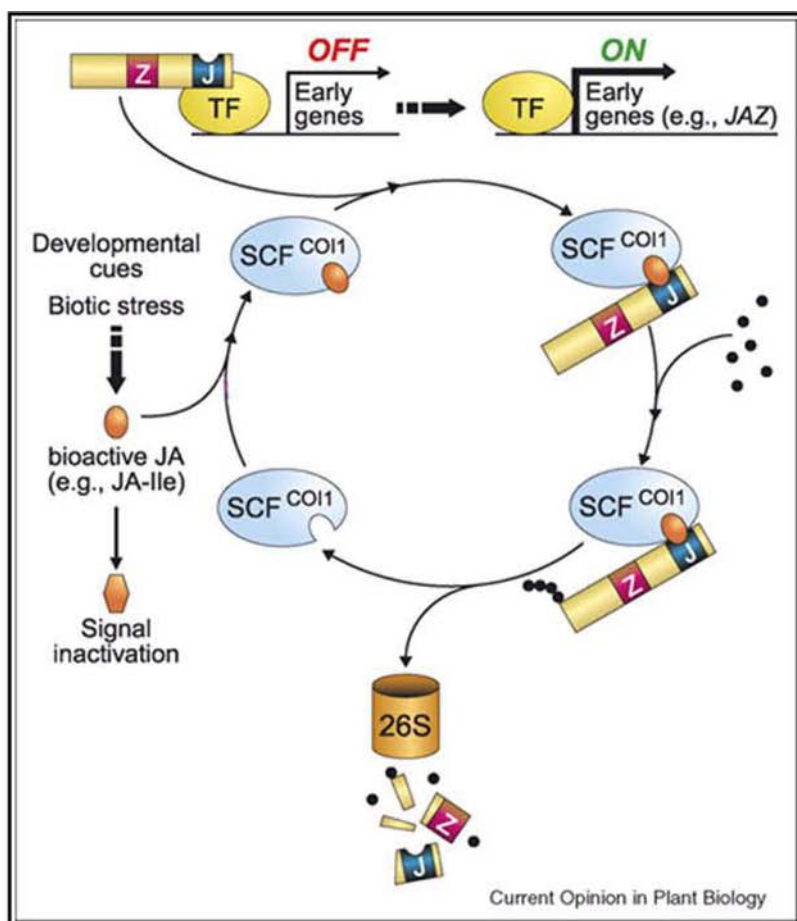


Figure 12 : Modèle de transduction du signal de l'acide jasmonique (d'après Katsir et al, 2008).

Quand le niveau de JA est bas, dans la cellule, les gènes de réponses à l'acide jasmonique sont réprimés (OFF) par les protéines JAZ caractérisées par leurs domaines JA-ZIM (Z et J) et les facteurs de transcription (TF) (ex. MYB2) sont bloqués. En cas de stress biotique le niveau d'acide jasmonique s'accumule dans la cellule. Le complexe SCF^{COI1} activé par l'hormone se fixe par son domaine LRR aux protéines JAZs et provoque leur ubiquitination et leur dégradation. Les facteurs de transcription deviennent capables d'activer l'expression des gènes de la voie de l'acide jasmonique.

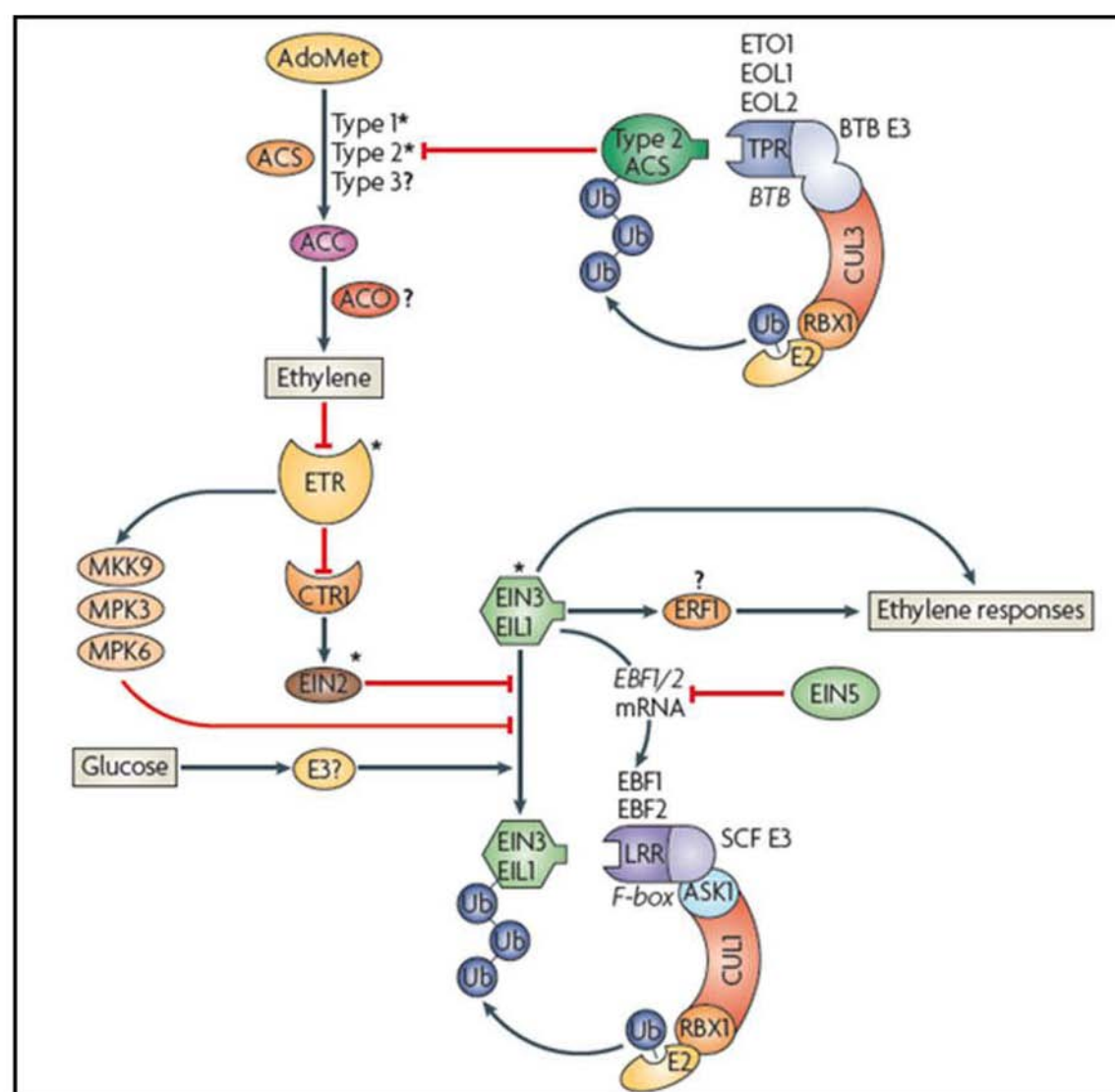


Figure 13 : Modèle de contrôle et perception de l'éthylène par la voie Ubiquitine / protéasome 26S (d'après Vierstra, 2009).

L'éthylène est synthétisé à partir de la Méthionine par l'action de deux enzymes l'ACC synthase (ACS) et l'ACC oxydase (ACO). La stabilité des enzymes ACC synthase de type 1 et 2 et ACC oxydase dépend de l'enzyme E3 ligase de type CUL3-BTB/POZ et leur dégradation est bloquée par l'éthylène. L'hormone se lie au récepteur ETR pour désactiver sa fonction (régulation négative). La protéine EIN2, (régulateur positif) stimule la transcription des activateurs de transcription EIN3 et EIL1 qui vont stimuler à leur tour la transcription des gènes de réponse à l'éthylène.

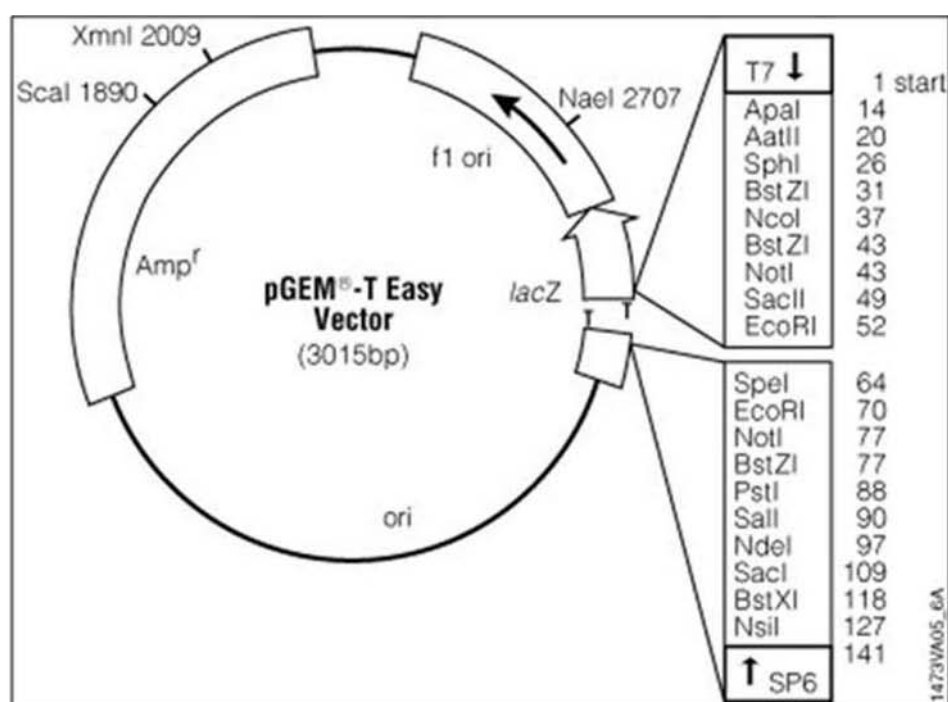


Figure 14 : Schéma du vecteur pGEM[®]-T Easy (proméga).

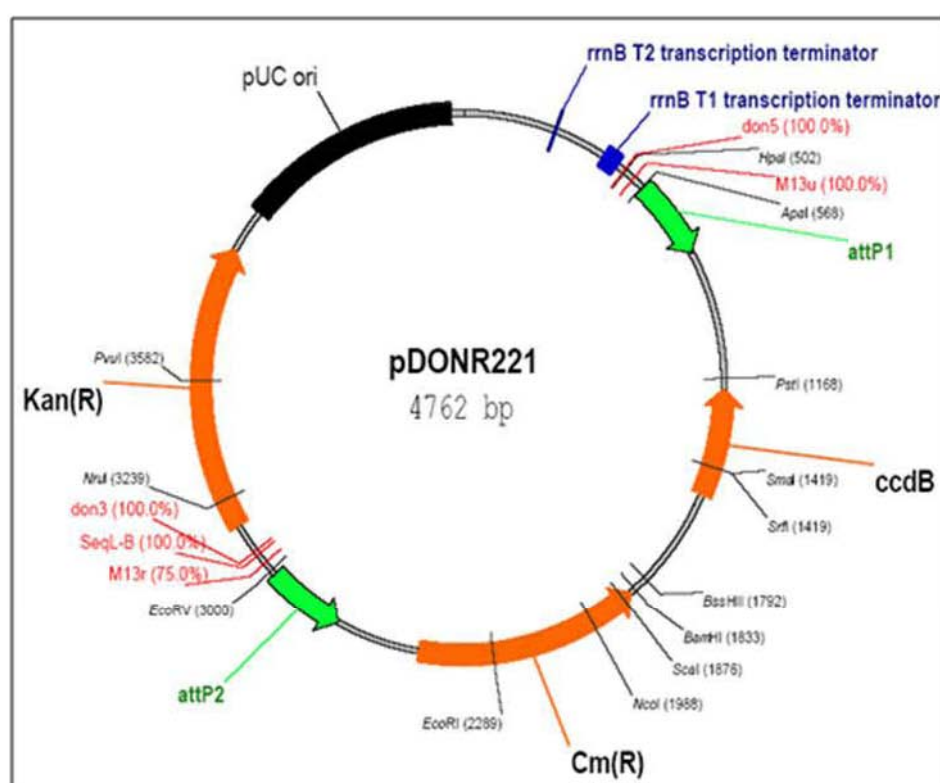


Figure 15 : Schéma du vecteur donneur pDONR[™]221 (Invitrogen)

Le vecteur porte deux sites de recombinaison attP1 et attP2.

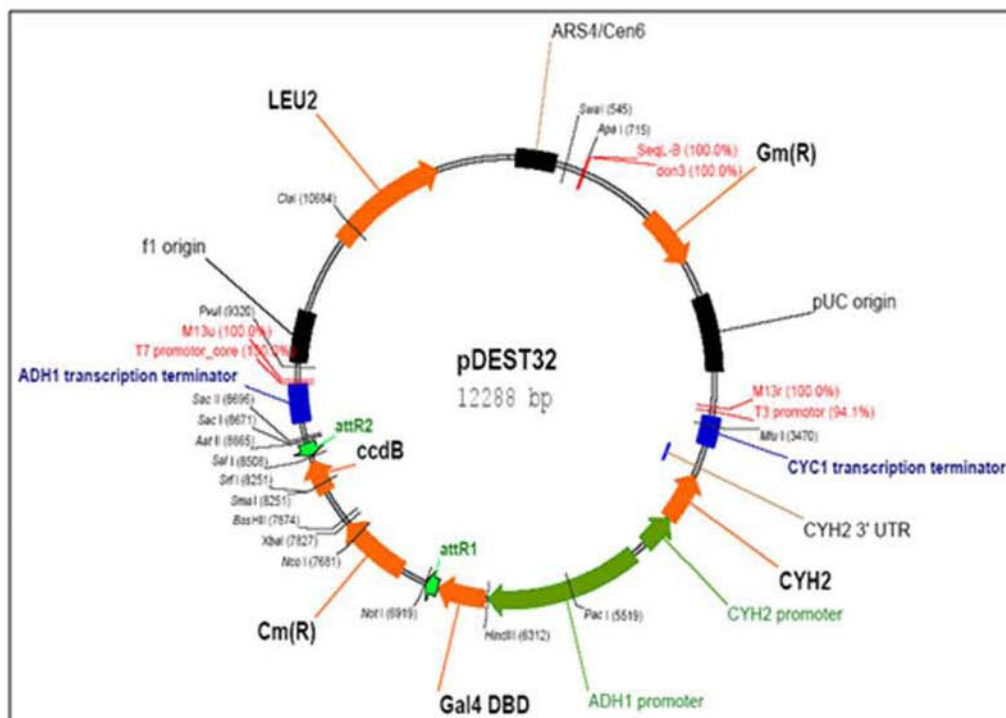
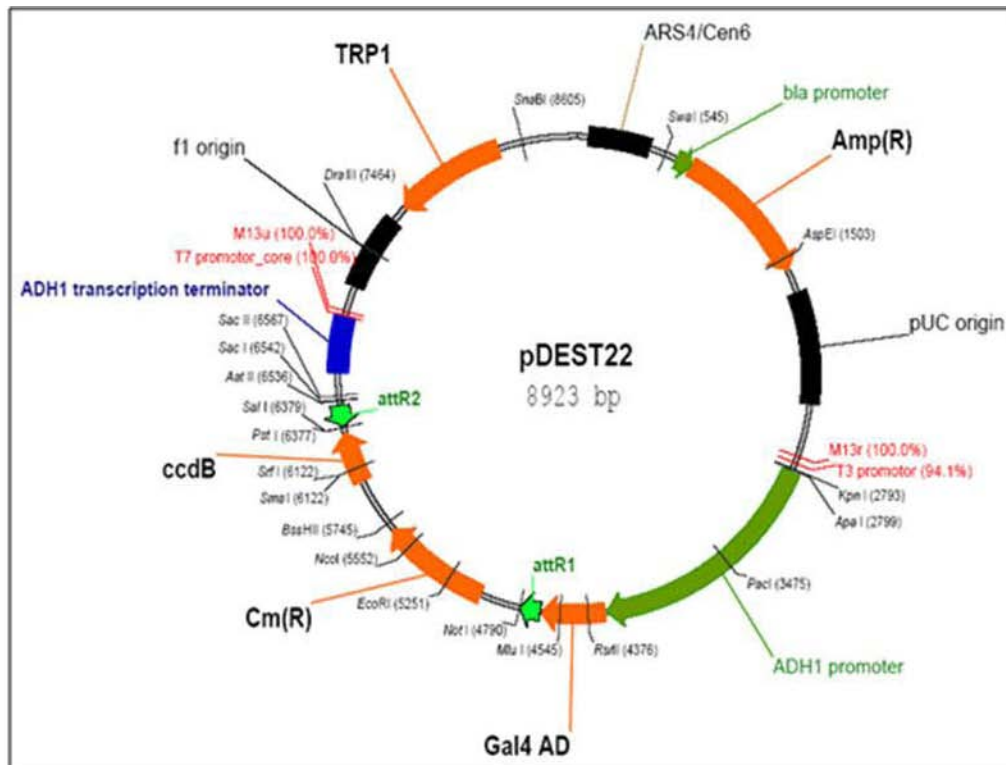


Figure 16 : Schémas des vecteurs de destination.

(a) pDESTTM22 et (b) pDESTTM32 (Invitrogen). Ces deux vecteurs possèdent deux sites de recombinaison attR1 et attR2.

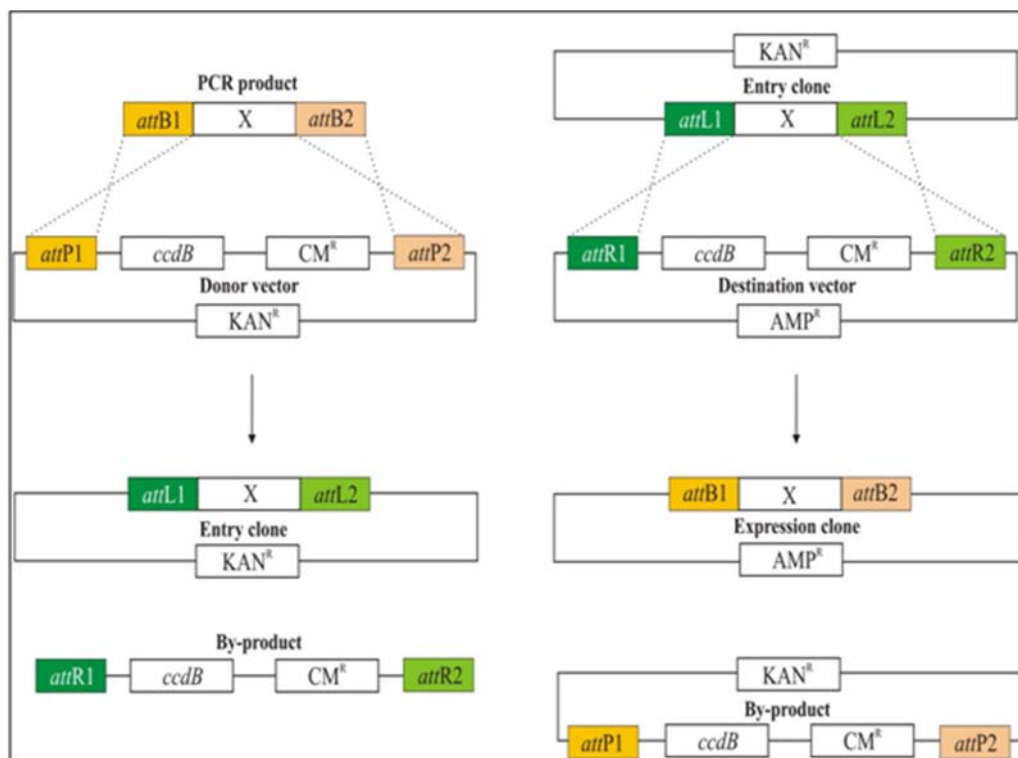


Figure 17 : Représentation schématique du système Gateway™ (d'après Magnani et al, 2006).

Le produit de PCR bordé des séquences de recombinaison AttB est sous cloné dans un vecteur donneur (réaction BP), avant d'être transféré dans un vecteur d'expression (réaction LR). Les sous-produits comportent le gène *ccdB* dont le produit est létal pour les bactéries ayant intégrées un sous-produit ou un vecteur donneur non-recombinant.

attP, *attB*, *attR* et *attL* : sites de recombinaison.

ccdB : gène codant pour une protéine toxique pour la plupart des souches bactériennes.

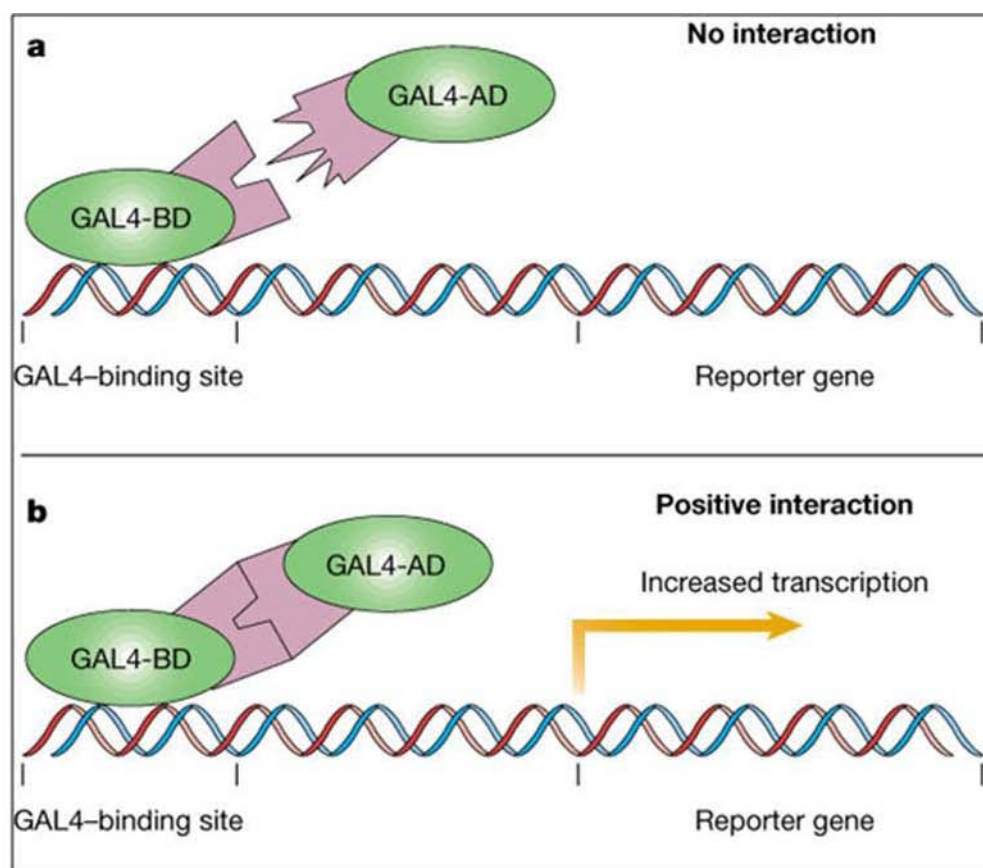


Figure 18 : Principe du double hybride (d'après Pandey et al, 2000).

La souche de levure est co-transformée avec les deux plasmides codant respectivement pour les protéines chimères proie (GAL4-AD) et appât (GAL4-BD). En cas d'interaction entre ces deux protéines (b), les deux domaines sont reconstitués, ce qui a pour conséquence d'activer l'expression des gènes rapporteurs.

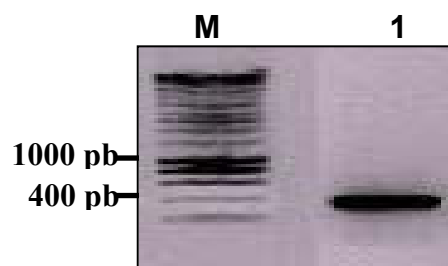


Figure.19 : PCR sur ADNc avec les amorces de Skp1 (TSK16)

(1) SKP1 404 pb M : marqueur de taille moléculaire. PCR réalisée sur 40 cycles, avec une température d'hybridation de 60°C.

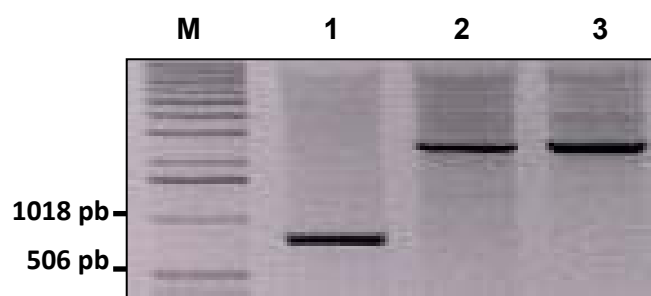


Figure.20 : PCR sur ADNc avec les amorces de Cullin1

(1) Cullin1 2554 pb ; (2) Cullin1 2512 pb ; (3) Cullin1 2558 pb ; M : marqueur de

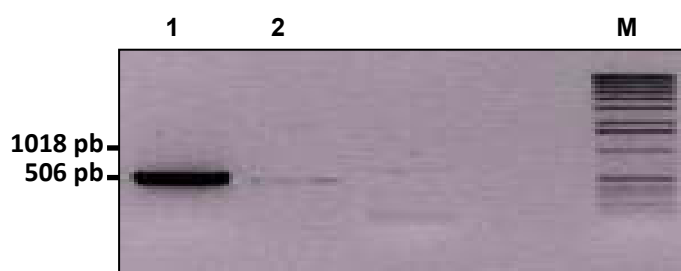


Figure. 21 : PCR sur ADNc de feuilles avec les amorces de Rbx1

(1) Rbx1 492 pb, (2) Rbx1 630 pb ; M : marqueur de taille moléculaire. PCR réalisée sur 40 cycles, avec une température d'hybridation de 60°C.

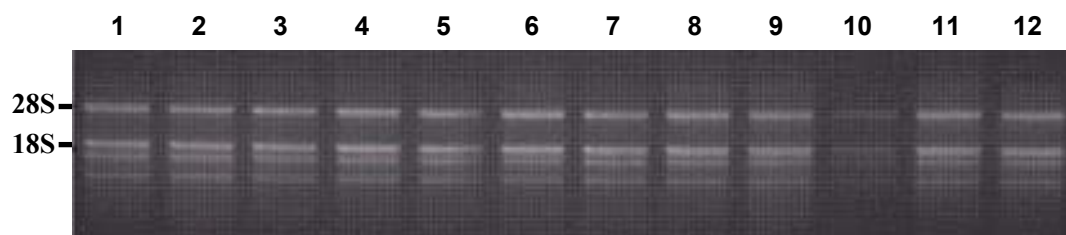


Figure.22. ARN totaux extraits de plantules prélevées à T0, T2, T6, T10, T24 et T48 heures : (1-6) plantules non traitées ; (7-12) plantules traitées par pulvérisation d'eau.

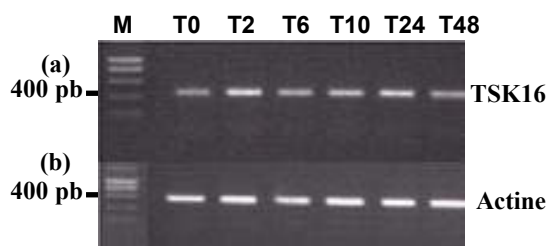


Figure.23. RT-PCR à partir des ARN totaux extraits de plantules traitées par pulvérisation de 2,4D, avec les amorces : (a) TSK16 (404 pb) et (b) Actine (432 pb). PCR réalisée sur 28 cycles, avec une température d'hybridation de 60°C.

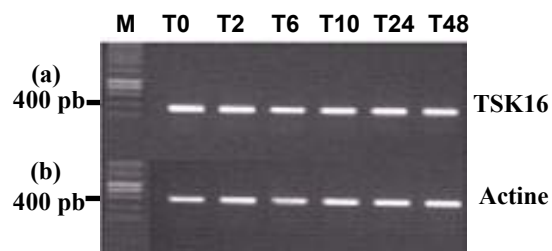


Figure.24. RT-PCR à partir des ARN totaux extraits de plantules traitées par pulvérisation de GA3, avec les amorces : (a) TSK16 (404 pb) et (b) Actine (432 pb). PCR réalisée sur 28 cycles, avec une température d'hybridation de 60°C.

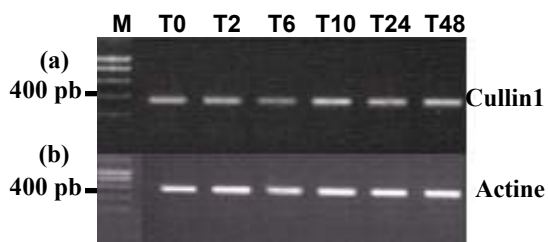


Figure.25. RT-PCR à partir des ARN totaux extraits de plantules traitées par pulvérisation de 2,4D, avec les amorces : (a) Cullin1 (354 pb) et (b) Actine (432 pb). PCR réalisée sur 28 cycles, avec une température d'hybridation de 60°C.

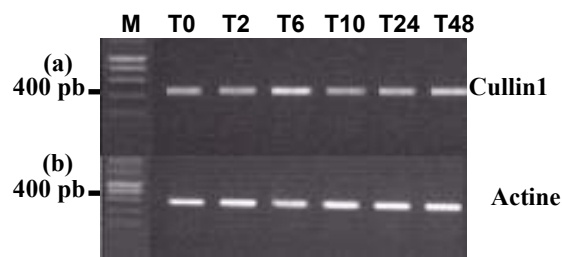


Figure.26. RT-PCR à partir des ARN totaux extraits de plantules par pulvérisation de GA3, avec les amorces : (a) Cullin1 (354 pb) et (b) Actine (432 pb). PCR réalisée sur 28 cycles, avec une température d'hybridation de 60°C.

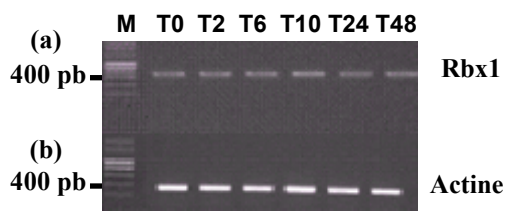


Figure.27. RT-PCR à partir des ARN totaux extraits de plantules traitées par pulvérisation de 2,4D, avec les amorces : (a) Rbx1 (492 pb) et (b) Actine (432 pb). PCR réalisée sur 25 cycles, avec une température d'hybridation de 60°C.

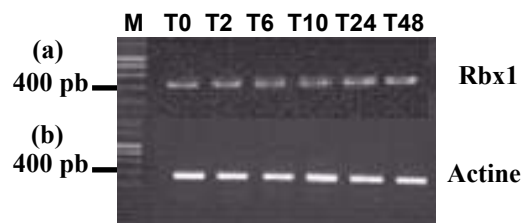


Figure.28. RT-PCR à partir des ARN totaux extraits de plantules traitées par pulvérisation de GA3, avec les amorces : (a) Rbx1 (492 pb) et (b) Actine (432 pb). PCR réalisée sur 25 cycles, avec une température d'hybridation de 60°C.

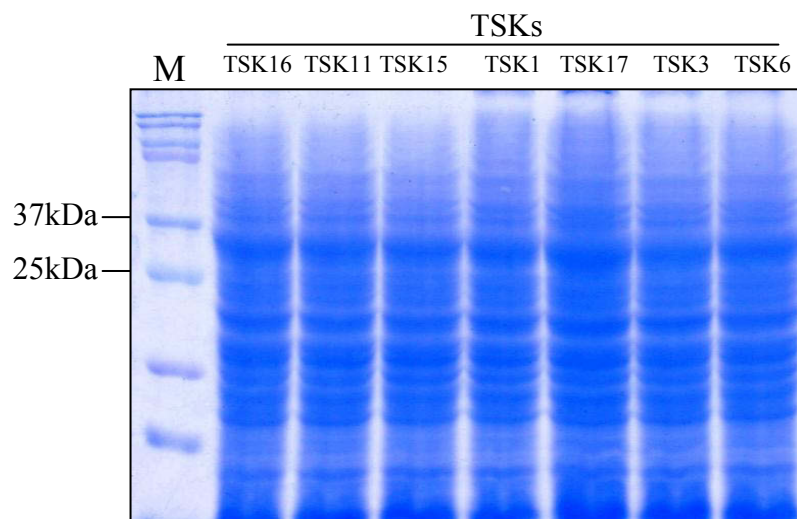


Figure.29. Electrophorèse SDS-PAGE 10% de l'expression de la protéine de fusion TSKs et GAL4-BD par la souche MaV203 de levure à l'aide du plasmide pDEST32. M = Echelle de poids moléculaires.

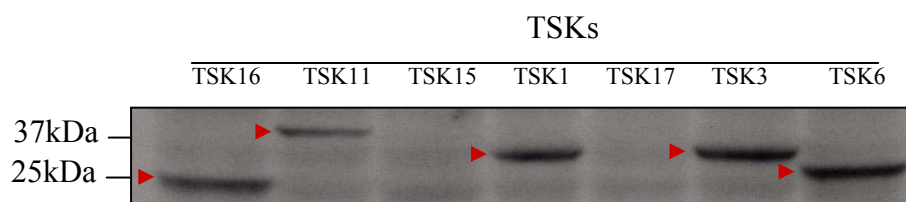


Figure.30. western-blot réalisé sur des échantillons prélevés au cours de la croissance en utilisant des anticorps anti-GAL4-BD (3 μ g/l).

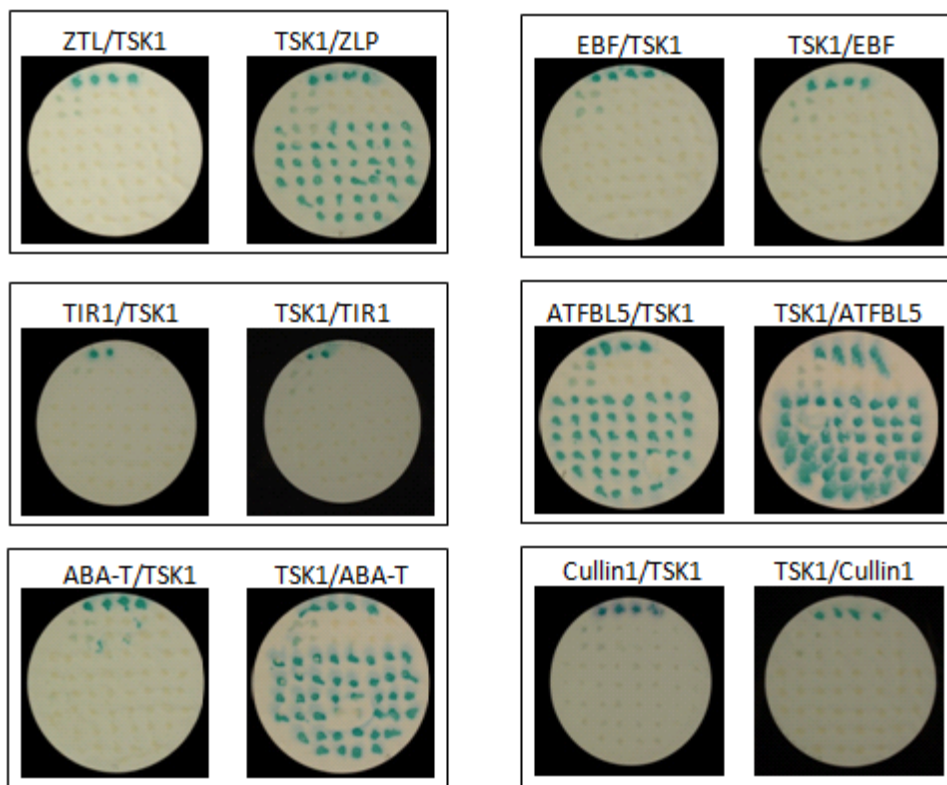


Figure.31. Test d'activité X-Gal des candidats F-box (ZTL, TIR1, ATFbL5, EBF et ABA-TUBBY) et la Cullin1 en interaction avec la protéine TSK1. Toutes les fusions sont données dans le sens pDEST22/pDEST32

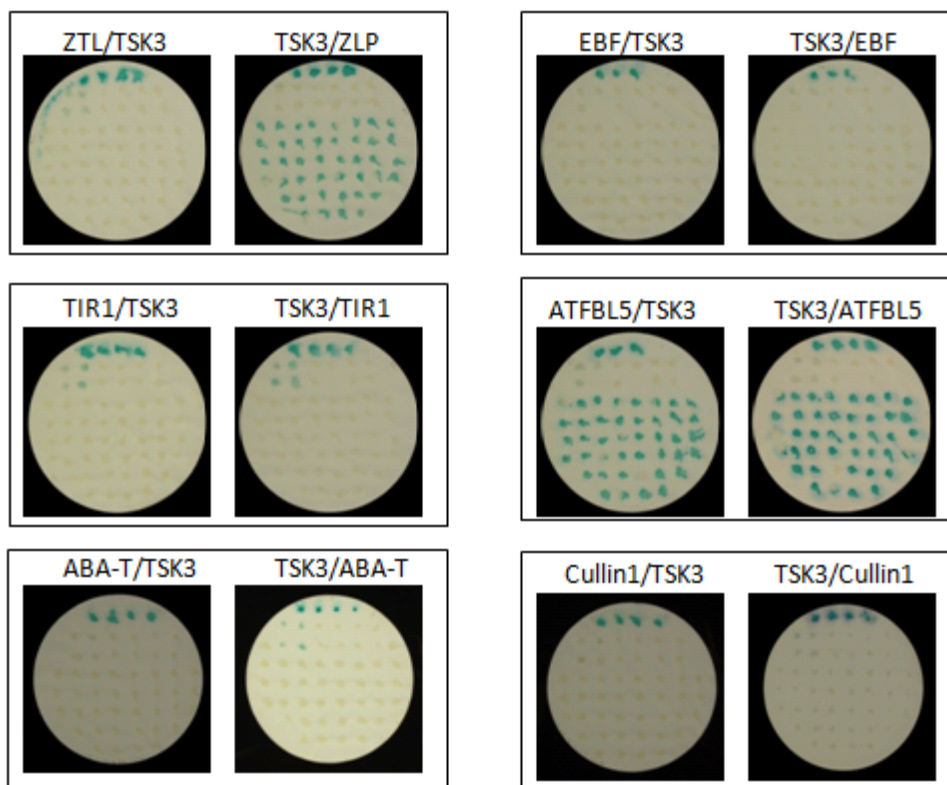


Figure.32. Test d'activité X-Gal des candidats F-box (ZTL, TIR1, ATFbL5, EBF et ABA-TUBBY) et la Cullin1 en interaction avec la protéine TSK3. Toutes les fusions sont données dans le sens pDEST22/pDEST32

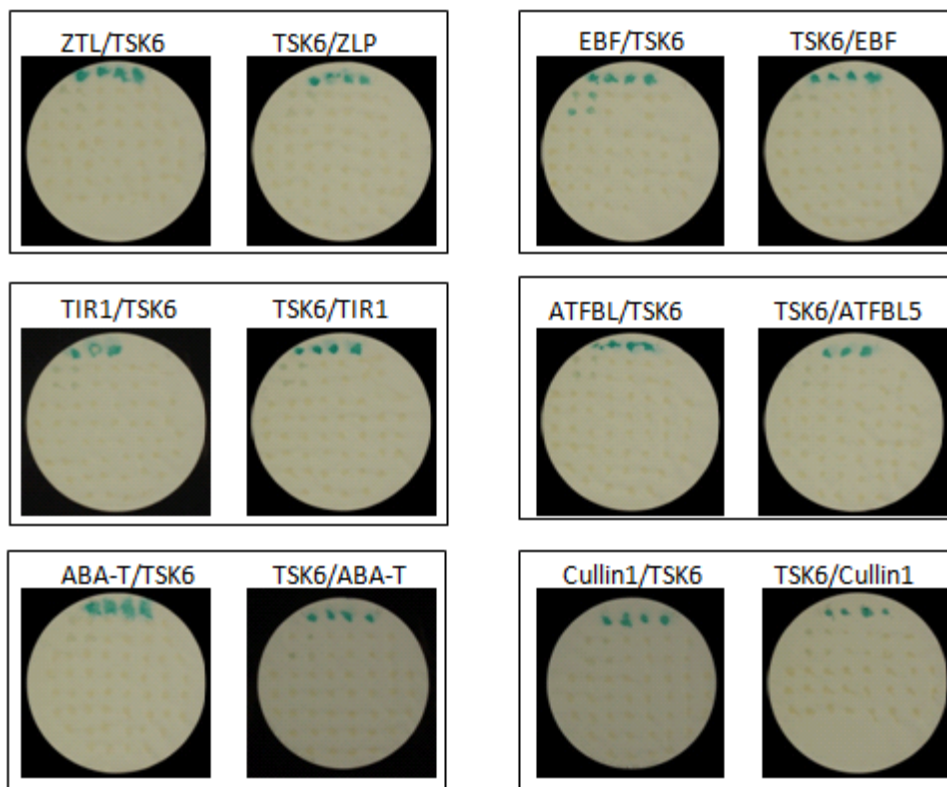


Figure.33. Test d'activité X-Gal des candidats F-box (ZTL, TIR1, ATFL5, EBF et ABA-TUBBY) et la Cullin1 en interaction avec la protéine TSK6. Toutes les fusions sont données dans le sens pDEST22/pDEST32

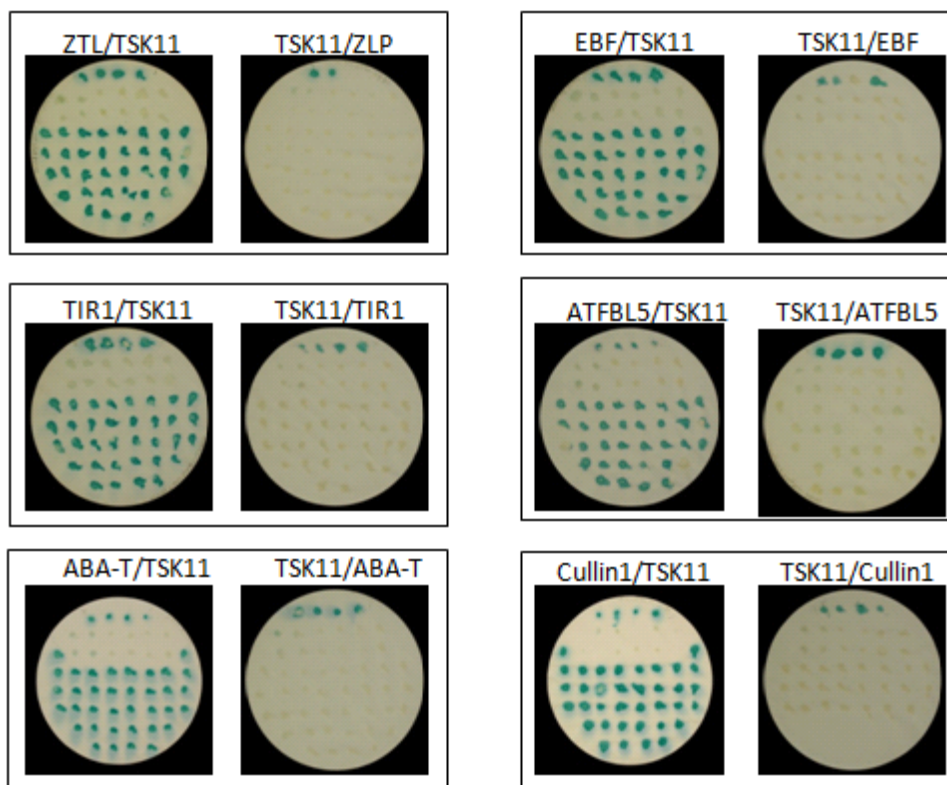


Figure.34. Test d'activité X-Gal des candidats F-box (ZTL, TIR1, ATFL5, EBF et ABA-TUBBY) et la Cullin1 en interaction avec la protéine TSK11. Toutes les fusions sont données dans le sens pDEST22/pDEST32

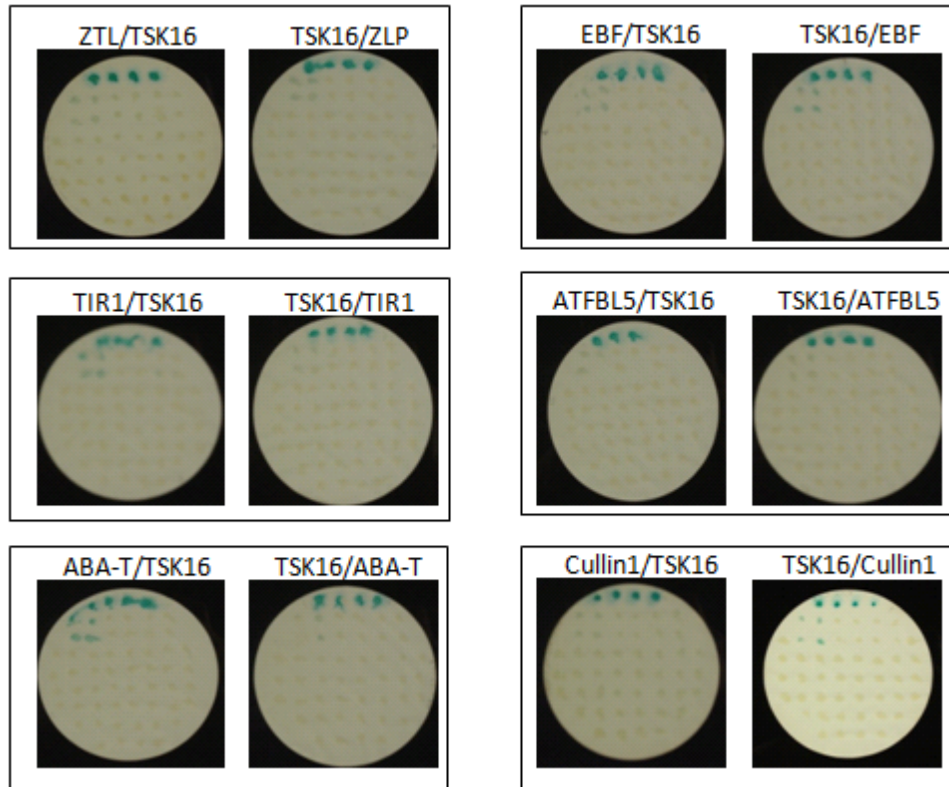


Figure.35. Test d'activité X-Gal des candidats F-box (ZTL, TIR1, ATFbL5, EBF et ABA-TUBBY) et la Cullin1 en interaction avec la protéine TSK16. Toutes les fusions sont données dans le sens pDEST22/pDEST32

	Additional domain										POZ domain											
Ins-Tsk6	:	MAADAASPAV	PDEAEAEAKPSSSSEEVKEPEPGTEKQE	EKKKLT	ILKSSDGEDFEVEVAVAMASQT	IKHMVEDGCADNII	PLPNV	:	84													
Tsk6-Wt	:	MAADAASPAV	-----	--KKLT	ILKSSDGEDFEVEVAVAMASQT	IKHMVEDGCADNII	PLPNV	:	54													
Tsk11-Wt	:	MSAAAAAVAV	PDEAEAEAKPSSSSEEVKEPEPGTEKQE	EKPATV	LVAE	DCVEVRIAEP	PAARMSQMLRHMMEDGCADGR	IPTANI	:	84												
Del-TSK11	:	-----	-----	MEKPATV	LVAE	DCVEVRIAEP	PAARMSQMLRHMMEDGCADGR	IPTANI	:	47												

	POZ domain										SKP1 and dimerization domain											
Ins-Tsk6	:	TAKILSKVIEYCTQHAP	-KADDA	AAAAD	-----	SATAVKPDEEKL	KAFDAEFVKVEQATLFD	LILAANYLD	:	148												
Tsk6-Wt	:	TAKILSKVIEYCTQHAP	-KADDA	AAAAD	-----	SATAVKPDEEKL	KAFDAEFVKVEQATLFD	LILAANYLD	:	118												
Tsk11-Wt	:	HSDILEMVVEYCEKHG	PYYDPEASER	DRYPFP	FPFPIELTPTVSSIKPV	TYVDPDPHGLK	DWDNDFISLDNSTLFEI	IILAANYLN	:	168												
Del-TSK11	:	HSDILEMVVEYCEKHG	PYYDPEASER	DRYPFP	FPFPIELTPTVSSIKPV	TYVDPDPHGLK	DWDNDFISLDNSTLFEI	IILAANYLN	:	131												

	SKP1 and dimerization domain											
Ins-Tsk6	:	IKGLLDITCQTVA	DMIKGKTPEEIRK	TENIT	NDFTPEEEEEVRKENQ	WAFE-	:	199				
Tsk6-Wt	:	IKGLLDITCQTVA	DMIKGKTPEEIRK	TENIT	NDFTPEEEEEVRKENQ	WAFE-	:	169				
Tsk11-Wt	:	IEDLLDIGTSTVA	DKMRGKKPEEIREI	FEI	ENDYTPEQAEVRKENA	WAFED	:	220				
Del-TSK11	:	IEDLLDIGTSTVA	DKMRGKKPEEIREI	FEI	ENDYTPEQAEVRKENA	WAFED	:	183				

Figure.37. Alignement des séquences protéiques de TSK11 complète, TSK11 tronqué, TSK6 complète et de TSK6 chimérique.

Les résidus d'acides aminés identiques sont encadrés en noir. Le domaine POZ, le domaine SKP1 ainsi que le domaine de dimérisation sont indiqués par un trait plein. Le nouveau domaine (New domain) est encadré en noir.

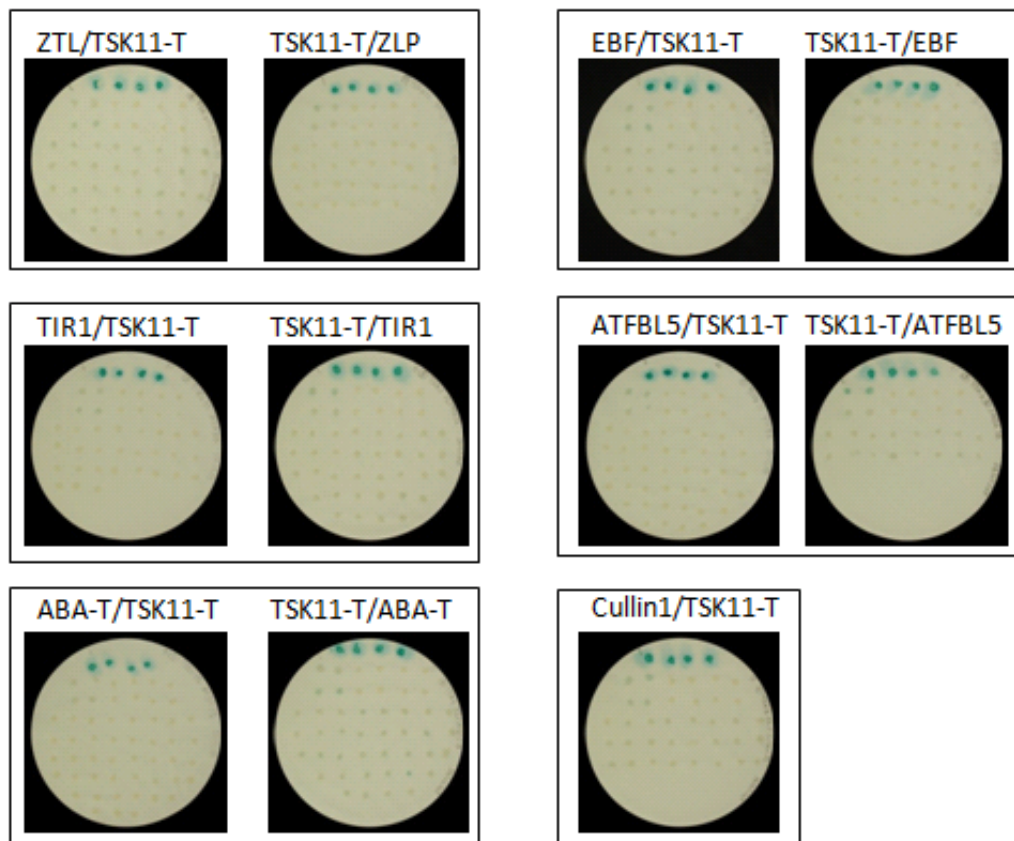


Figure.38. Test d'activité X-Gal des candidats F-box (ZTL, TIR1, ATFbL5, EBF et ABA-TUBBY) et la Cullin1 en interaction avec la protéine TSK tronquée (TSK11-T). Toutes les fusions sont données dans le sens pDEST22/pDEST32.

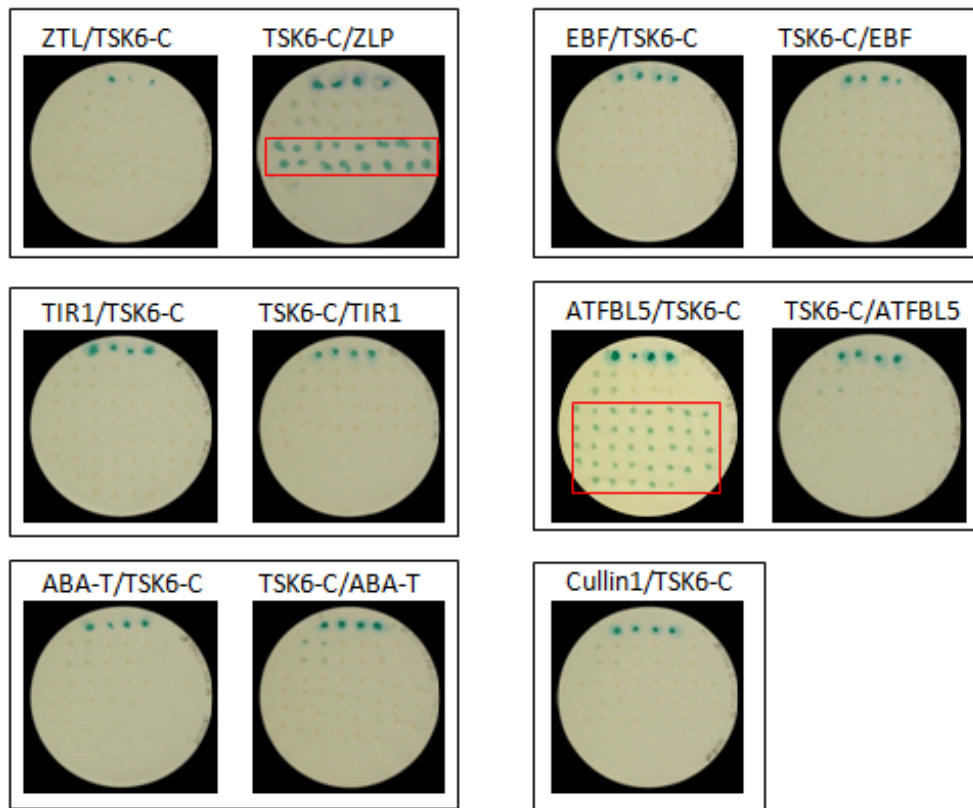


Figure.39. Test d'activité X-Gal des candidats F-box (ZTL, TIR1, ATFbL5, EBF et ABA-TUBBY) et la Cullin1 en interaction avec la protéine chimère TSK6 (TSK6-C). Toutes les fusions sont données dans le sens pDEST22/pDEST32



Figure.40. Test de dimerisation de la protéine TSK11 complète et tronquée.

Analyse par criblage double-hybride de l'homodimérisation de la protéine TSK11 complète (a) et tronquée (b). C+ and C- indiquent les souches qui ont servi de contrôles positif et négatif.

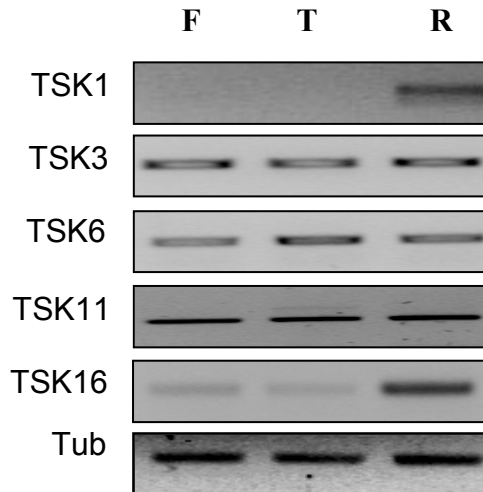


Figure.41. Analyse par RT-PCR de l'expression de 5 gènes TSK.

Les ARN totaux sont extraits de Feuilles (F), Tige (T) et Racines (R) de jeunes plantules de blé *Triticum aestivum* et l'accumulation des transcrits est testée par RT-PCR.

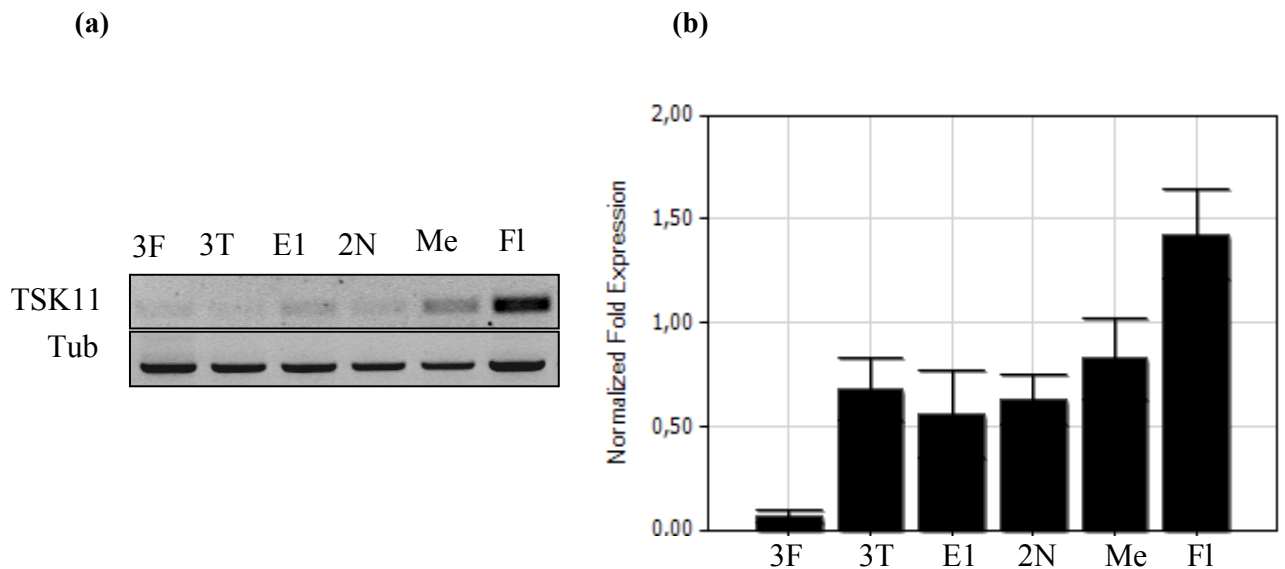


Figure.42. Quantification du gène TSK11 par RT-PCR quantitative en temps réel.

(a) Expression par RT-PCR semi-quantitative du gène TSK11 dans les feuilles à différents stades de développement 3 Feuilles (F), 3 Thalles (T), Epi 1cm (E), 2Noueds (N), Méiose (M) et Floraison (F). **(b)** Le niveau de l'expression des gènes TSK11 et Tubuline (gènes de référence) a été quantifié par RT-q-PCR. Les résultats sont analysés par le logiciel iQ5 de BioRad. Les valeurs représentent la moyenne de l'intensité relative du gène TSK11 des triplicats techniques après normalisation par la tubuline. Deux répétitions biologiques ont été réalisées.

Tableau 1 : Classification génomique des *Triticum* (Feillet, 2000).

Forme sauvage	Forme cultivée	Nom commun	Nombre de chromosomes (2n)	Nature des génomes
<i>T.boeoticum</i>	<i>T.monococcum</i>	engrain	14	AA
<i>T.urartu</i>			14	AA
<i>T.dicoccoides</i>	<i>T.dicoccum</i>	Blé poulard	28	AABB
	<i>T.durum</i>	Blé dur	28	AABB
	<i>T.polonicum</i>	Blé de pologne	28	AABB
	<i>T.turgidum</i>		28	AABB
	<i>T.araraticum</i>		28	AABB
T.mon x T.spe x As.	<i>T.aestivum</i>	Blé tender	42	AABBDD
	<i>T.spelta</i>	Epeautre	42	AABBDD
	<i>T.sphaerococcum</i>	Blé indien nain	42	AABBDD
	<i>T.compactum</i>	Blé club	42	AABBDD

T : *Triticum*

T. mon x T.sp x As : *T. monococcum* x *T. speltoides* x *Aegilops squarosa*.

Tableau 2 : Organisation génomique de la voie ubiquitine-protéasome dépendante chez *Arabidopsis* (Vierstra, 2003, 2009).

Protéines	Nombre des gènes
Ub	16
E1	2
E2	37
E3	
HECT	7
SCF F-box	700
RBX–Cullin–ASK	33
Ring finger,	477
U-box	41
<i>APC</i> .	20
<i>DUBs</i>	32
<i>26S protéasome</i>	
<i>20S CP</i>	23
<i>19S RP</i>	31

APC : anaphase-promoting complex ; CP : core protease ; DUBs : deubiquitination enzymes
E1, Ub-activating enzyme ; E2 : Ub-conjugating enzyme ; E3 : Ub-protein ligase ; HECT :
homology to E6-AP C-terminus ; RP : regulatory particle ; SCF : SKP1, CDC53 and F-box
protein complex ; Ub : ubiquitine.

Tableau 3 : Exemples de protéines F-box impliquées dans des processus physiologiques chez les plantes (Jain et al, 2007)

F-box protein	Name	Organism	Function	References
COI1	Coronatine Insensitive 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Jasmonate-Regulated defense responses, pollen fertility	Xie et al., 1998; Xu et al., 2002; Devoto et al., 2005
ORE9/MAX2	Oresara 9/ More Axillary 2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Regulation of leaf senescence, selective repression of axillary shoots	Woo et al., 2001; Stirnberg et al., 2002
TIR1	Transport Inhibitor Response 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Auxin receptor	Gray et al., 1999; Gray et al., 2001; Dharmasiri et al., 2005a; Kepinski and Leyser 2005
AFB1/GRH1	Auxin signaling F Box protein 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Auxin receptor, plant growth and development	Dharmasiri et al., 2005b
AFB2	Auxin signaling F Box protein 2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Auxin receptor, plant growth and development, glucose repression	Dharmasiri et al., 2005b
AFB3	Auxin signaling F Box protein 3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Auxin receptor, plant growth and development	Dharmasiri et al., 2005b
SON1	Suppressor Of nim1-1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Defense responses	Kim and Delaney, 2002
UFO	Unusual Floral Organs	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Determination of floral meristem and floral organ identity	Levin and Meyerowitz, 1995; Wilkinson and Haughn, 1995; Samach et al., 1999; Durfee et al., 2003; Laufs et al., 2003; Hepworth et al., 2006
EID1	Empfindlicher Im Dunkelroten Licht 1 (More sensitive in far-red light)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Negative regulator in phytochrome A-specific light signaling	Dieterle et al., 2001; Marrocco et al., 2006
AFR	Attenuated Far-Red Response	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Positive regulator of phytochrome A-mediated light signaling	Harmon and Kay, 2003
EBF1	EIN3-Binding F box protein 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Negative regulator of ethylene-signaling , plant growth	Guo and Ecker, 2003; Potuschak et al., 2003; Gagne et al., 2004
EBF2	EIN3-Binding F box protein 2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Negative regulator of ethylene-signaling, plant growth	Guo and Ecker, 2003; Potuschak et al., 2003; Gagne et al., 2004
ZTL/LKP1	Zeitlupe	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Circadian rhythm, photomorphogenesis and flowering time	Somers et al., 2000; Han et al., 2004; Somers et al., 2004
LKP2/FKL	Lov Kelch Protein 2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Circadian clock regulation and flowering time control	Schultz et al., 2001
SLY1	Sleepy 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Positive regulator of Gibberellic acid signaling	McGinnis et al., 2003; Dill et al., 2004
SNE	Sneezy	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Positive regulator of Gibberellic acid signaling	Strader et al., 2004
FKF1	Flavin-Binding, Kelch Repeat, F-box 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Regulates photoperiodic flowering	Nelson et al., 2000; Imaizumi et al., 2003, 2005
CEG (AtSFL61)	Cegenduo	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Negative regulator of auxin-mediated lateral root formation	Dong et al., 2006
GID2	Gibberellin Insensitive Dwarf 2	<i>Oryza sativa</i>	Positive regulator of Gibberellic acid signaling	Itoh et al., 2003; Sasaki et al., 2003; Gomi et al., 2004
D3	Dwarf3	<i>Oryza sativa</i>	Control of tiller bud activity	Ishikawa et al., 2005
FIM	Fimbriata	<i>Antirrhinum majus</i>	Floral differentiation	Simon et al., 1994; Ingram et al., 1997
AhSLF-S2	Self-incompatibility Locus-encoded F-box protein	<i>Antirrhinum hispanicum</i>	Controls pollen function of S-Rnase-based self-incompatibility	Lai et al., 2002; Qiao et al., 2004a, 2004b
SFB3	S haplotype-specific F-box protein	<i>Prunus avium</i>	Male determinant of gametophytic self incompatibility	Yamane et al., 2003; Ushijima et al., 2004; Sonneveld et al., 2005

Tableau 4 : Séquences des amorces utilisées pour la RT-PCR.

Gènes TaSKP	Séquences des amorces RT-PCR
TaSKP1	5'-ATCCCGCTCCGGAGGGGGG-3'
	5'-AAAGGCCCACTGGTTCTCCG-3'
TaSKP3	5'-GCGAGAAGAAGATGATCACA-3'
	5'-CGGCTCCGGCGGCAGCCCCA
TaSKP6	5'-TGGCGTCGCAGACCATCAAG-3'
	5'-CTCCGGGGTGAAGTCGTTGG-3'
TaSKP11	5'-GAGGAGGTAAAGGAGCCGGA-3'
	5'-GTCCGGGTCGACGTAGGTGA-3'
TaSKP16	5'-ACCCTCTTCGACCTCATCCT-3'
	5'-TGATGACCACTGACCACGAT-3'
Tubulin	5'-CTGGCTTCAAGTGTGGTATCAA-3'
	5'-AGCAAACGTTCAAACAGACAGA-3'

Tableau 5 : Séquences des amorces utilisées pour le clonage GATEWAY.

Gènes SCF du blé	Séquences des amorces (attb + gènes spécifiques)
TaSKP1	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCGGCCGCGGGAGACGC-3'
	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCATGAAACCATTATGATGACA-3'
TaSKP3	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCGGCCGCGGGAGACGC-3'
	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTGTTACCGACACCACCTCA-3'
TaSKP4	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCGGCCGCGGGAGACGC-3'
	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCGAAGATGTTACCGACACC-3'
TaSKP5	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCGGCCGCGGGAGACGC-3'
	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCATGACCAATACTAAGCATTG-3'
TaSKP6	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCGGCCGACGCGGCATC-3'
	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTGGCTGCTCCAGGCATTCGA-3'
TaSKP7	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCGACCCGAGAGGCAGG-3'
	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCAAAACATAAAGAGTGCAGTT-3'
TaSKP10	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCGGCCGCGGGAGACGC-3'
	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACGCAACCTCATAACTCCAG-3'
TaSKP11	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGTCTGCCGCCGCCGCTGC-3'
	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCCGACTCATCCATCTATTTA-3'
TaSKP15	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCGGCCGCGGGAGACGC-3'
	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCATAGACTCGAGGATAATTAC-3'
TaSKP16	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCGGCCGCGGGAGACGCCGGC-3'
	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCGATTTCAGTTTGACAAGTGATGACC-3'
TaSKP17	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGTCTGTCTGGTATGGGAGC-3'
	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTACTCGATTCTTCCTCCTC-3'
TaSKP18	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCGGCCGCGGGAGACGC-3'
	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCATGACATAACAAAGGGCGC-3'
TaSKP19	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCGGCCGCGGGAGACGC-3'
	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCATCCAGCACGGACAGCATCA-3'
ZTL-like	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGTTACGTTTCGCCATCG-3'
	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAAACAGAGTTACTACTAG-3'
TIR1-like	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGAGCGCTCCCCCTCCTCCTC-3'
	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCATCTTCAGTCAGATCCCGTACC-3'
ATFbL5-like	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACTGCGGCAGCTAAACTC-3'
	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCATGATCCACACAGGGAGTG-3'
EBF-like	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCAAATGCCCTTGGCCTGCAG-3'
	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAAGCAAGGATGTCGCACCACCA-3'
ABA-TUBBY-like	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCCTTTGGGAGTTGGGATGCTA-3'
	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTGGAACCTTCTGGCAACAC-3'
Cullin1-like	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCGGGCCACGGGCAGGA-3'
	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCAA TCT AAG TCA TTA AAA-3'

F-box protein		TSK protein				
Name	Domain	TSK1	TSK3	TSK6	TSK11	TSK16
ZTL	PAS	+	+	-	a	-
ATFBL5	LRR	+	+	-	a	-
EBF	LRR	-	-	-	a	-
TIR1	LRR	-	-	-	a	-
ABA-T	Tubby	+	-	-	a	-
Cullin protein		TSK1	TSK3	TSK6	TSK11	TSK16
Cullin1		-	-	-	a	-

Tableau.6 : Récapitulatif des résultats du double-hybride entre les protéines TSK (proie) /F-box ou Cullin1 (appât) et TSK (appât) /F-box ou Cullin1 (proie). Les symboles (+), (-) et (a) représentent respectivement une interaction positive, négative et une autoactivation. Les cellules en noir représentent une interaction détectée dans les deux sens alors que les cellules en gris une interaction détectée dans un seul sens.

Tableau.7 : Liste des acides aminés conservés des protéines SKP1-like du blé en comparaison avec ceux de la protéine SKP1 humaines (Hs-SKP1).

position des acides aminés dans Hs-SKP1	97	101	104	105	108	116	120	121	123	124	127	128	129	130	132	135	136	139	141	145	149	153	156	157	159	160
Hs-SKP1	Q	F	I	L	N	L	C	K	V	A	I	K	G	K	P	I	R	F	I	F	E	V	E	N	W	C
Ask1	Q	F	I	L	N	L	C	Q	V	A	I	K	G	K	P	I	R	F	I	F	E	V	E	N	W	A
Ask2	Q	F	I	L	N	L	C	Q	V	A	I	K	G	K	P	I	R	F	I	F	E	V	E	N	W	A
TSK1	Q	F	I	L	N	L	C	Q	V	A	I	K	G	K	P	I	R	F	I	F	E	I	E	N	W	A
TSK3	Q	F	I	L	N	L	C	Q	V	A	I	K	G	K	P	I	R	F	I	F	E	I	E	N	W	A
TSK6	Q	F	I	L	N	L	C	Q	V	A	I	K	G	K	P	I	R	F	I	F	E	V	E	N	W	A
TSK11	N	F	I	L	N	L	T	S	V	A	M	R	G	K	P	I	R	F	I	Y	Q	V	E	N	W	A
TSK12	Q	F	I	L	N	L	C	Q	V	A	I	K	G	K	P	I	R	F	I	F	E	I	E	N	W	A
Ca-Skp1	Q	F	I	L	N	L	C	Q	V	A	I	K	G	K	P	I	R	F	I	F	E	V	E	N	W	A
Bn-Skp1	Q	F	I	L	N	L	C	Q	V	A	I	K	G	K	P	I	R	F	I	F	E	V	E	N	W	A
Nt-Skp1-1	Q	F	I	L	N	L	C	Q	V	A	I	K	G	K	P	I	R	F	I	F	E	V	E	N	W	A
Dm-Skp1	Q	F	I	L	N	L	C	K	V	A	I	K	G	K	P	I	R	F	I	F	E	V	E	N	W	C
Ce-Skr-1	Q	F	I	L	N	L	C	K	V	A	I	K	G	K	P	I	R	F	I	F	E	I	E	N	W	C

Ca : *Capsicum annuum*, Bn : *Brassica napus*, Ce : *Caenorhabditis elegans*, Dm: *Drosophila melanogaster*, Nt : *Nicotiana tabacum*.